



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**“Filogenia y variabilidad genética de subespecies de
Apis mellifera (Linneo, 1758) determinada por tres
marcadores de ADN mitocondrial en el Perú”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en
Zoología

AUTOR

Xiomara Jeanleny MERINO MERINO

ASESOR

Dra. Rina Lastenia RAMÍREZ MESÍAS

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Merino, X. (2020). *Filogenia y variabilidad genética de subespecies de Apis mellifera (Linneo, 1758) determinada por tres marcadores de ADN mitocondrial en el Perú*. Tesis para optar el título de Bióloga con mención en Zoología. Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0003-1234-6503
DNI o pasaporte del autor	74225083
Código ORCID del asesor	0000-0003-1924-5844
DNI o pasaporte del asesor	07923272
Grupo de investigación	—
Agencia financiadora	Lima Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Perú, Lima, San Martín de Porres -12.0225; -77.0556
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2020
Disciplinas OCDE	-Genética y Herencia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07 -Zoología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.11



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las ...16:12..... horas del 18 de diciembre de 2020, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/rin-ppi-kxn> el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** de **XIOMARA JEANLENY MERINO MERINO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **UNMSM-20200039502**, la titulando expuso su tesis: **“FILOGENIA Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE SUBESPECIES DE *Apis mellifera* (Linneo, 1758) DETERMINADA POR TRES MARCADORES DE ADN MITOCONDRIAL EN EL PERÚ”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ...19, calificativo: aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** a **XIOMARA JEANLENY MERINO MERINO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las ...17:45.... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 18 de diciembre de 2020.



Firmado digitalmente por SILVA
DAVILA Diana Fernanda FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 18.12.2020 17:32:53 -05:00

Dra. DIANA SILVA DAVILA
(PRESIDENTA)



Firmado digitalmente por RAMIREZ
MESIAS Rina Lastenia FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 18.12.2020 17:35:22 -05:00

Dra. RINA RAMIREZ MESIAS
(ASESORA)



Firmado digitalmente por VIVAS RUIZ
Dan Erick FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 18.12.2020 17:38:19 -05:00

Dr. DAN VIVAS RUIZ
(MIEMBRO)



Firmado digitalmente por RAMIREZ
MALAVER Jorge Luis FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 18.12.2020 17:40:14 -05:00

Dr. JORGE RAMIREZ MALAVER
(MIEMBRO)

*A mi madre Marleni,
por su confianza,
fortaleza y apoyo incondicional.
A mi ángel Ernesto,
por dejarme las mejores lecciones de vida.*

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por construir los mejores pilares de mi formación, por guiarme en diferentes etapas de mi vida, por su cariño, esfuerzo y entrega incondicional.

A Ernesto, mi padre y amigo, por dejarme los mejores recuerdos, lecciones de superación y por haber sido pieza fundamental de mi formación.

A mi estimada asesora, Dra. Rina Ramírez, por su consideración, su pronta disposición y por ser guía y modelo en esta etapa de mi vida profesional.

A mi asesora externa, Francesca Falconi, por su paciencia, confianza y por su ejemplo en la búsqueda de igualdad de las mujeres en la sociedad, sobretodo en el camino de las ciencias.

Al Dr. Michael Talledo, coordinador general de la Unidad de Virología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la UPCH, por brindarme la oportunidad de continuar mi formación profesional en dicho grupo y por la confianza depositada en esta tesis. A mis compañeros y amigos Gabriela A., Jean Pierre, Sophia, Romina, Andrés y Giovanni por sus aportes, consejos y por su sincera amistad.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA, por el financiamiento del proyecto de investigación “Evaluación de efectos antiinflamatorios y antivirales del veneno de *Apis mellifera* en linfocitos infectados con el virus linfotrópico de células T humanas tipo I” del cual forma parte esta tesis (Convenio 024-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE).

A los diferentes apicultores que colaboraron con este trabajo, en especial al ingeniero Jorge Murakami, por brindarme las facilidades y herramientas necesarias para la realización del trabajo en campo.

Finalmente, agradezco a todas las personas e instituciones que de alguna manera contribuyeron con el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Descripción de <i>Apis mellifera</i>	4
2.1.1 Descripción morfológica.....	4
2.1.2 Estructura social.....	5
2.1.3 Reproducción.....	6
2.1.4 Ciclo de vida.....	7
2.2 Distribución de linajes y razas de <i>Apis mellifera</i>	8
2.3 Importancia ecológica y económica.....	12
2.4 Apicultura en el Perú.....	13
2.5 Situación actual.....	17
2.6 Marcadores moleculares (MM).....	18
2.6.1 Marcadores moleculares de proteínas.....	19
2.6.2 Marcadores moleculares de ADN.....	20
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3.1 Hipótesis.....	25
3.2 Objetivos.....	25
3.2.1 Objetivo general.....	25
3.2.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Zona de estudio.....	26
4.2 Colecta de abejas.....	26
4.3 Extracción y cuantificación del ADN total.....	30
4.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis.....	31
4.3.2 Secuenciamiento del ADN.....	32
4.4 Análisis Bioinformático.....	33
4.4.1 Ensamblaje y verificación de secuencias de ADN.....	33
4.4.2 Alineamiento múltiple de secuencias.....	34
4.4.3 Polimorfismo y diversidad genética de los genes.....	34
4.4.4 Análisis filogenético.....	35
4.4.5 Red de haplotipos – Network.....	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Extracción y cuantificación del ADN total.....	41

5.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis	41
5.3	Secuenciamiento de ADN	43
5.4	Análisis Bioinformático	43
5.4.1	Ensamblaje y verificación de secuencias de ADN	43
5.4.2	Alineamiento múltiple de secuencias	43
5.4.3	Polimorfismo y diversidad genética de los genes	44
5.4.4	Análisis filogenético.....	53
6.	DISCUSIÓN.....	70
6.1	Diversidad genética.....	70
6.2	Relaciones Filogenéticas	71
6.3	Redes de Haplotipos.....	73
6.4	Factor antropogénico en la disminución de la diversidad genética	74
7.	CONCLUSIONES	76
8.	RECOMENDACIONES.....	77
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
10.	ANEXOS	85
10.1	Ficha de Registro de apiarios muestreados	85
10.2	Lista de muestras procesadas y analizadas por cada gen	86
10.3	Porcentajes de identidad obtenidos con la herramienta BLAST de la base de datos del GenBank	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tiempo de desarrollo de un embrión por casta después de la puesta del huevo..	7
Tabla 2. Colmenas en producción por departamento y en porcentaje de producción a nivel nacional para el año 2012.	15
Tabla 3. Localidades de muestreo con coordenadas geográficas. Se muestra además el código asignado para cada localidad (ID), el cual fue empleado para asignar la identificación de cada muestra	29
Tabla 4. Cebadores de los marcadores de mtDNA empleados en el estudio	32
Tabla 5. Códigos de Acceso de los genes mitocondriales de las subespecies de <i>A. mellifera</i> empleadas en el presente trabajo, descargadas del GenBank y usadas como referencia en el presente trabajo.	39
Tabla 6. Composición promedio en porcentaje (%) de las bases nitrogenadas por cada gen empleado en el estudio	44
Tabla 7. Alineamiento múltiple de 28 secuencias nucleotídicas para el gen ND5 con los sitios polimórficos.	45
Tabla 8. Alineamiento múltiple de 29 secuencias nucleotídicas para el gen 16S rRNA con los sitios polimórficos.	46
Tabla 9. Alineamiento múltiple de 30 secuencias nucleotídicas para el gen mitocondrial COI indicando los 14 sitios polimórficos.....	47
Tabla 10. Porcentaje de frecuencias (%) de transiciones (Tr) y transversiones (Tv) de los genes ND5, 16S rRNA y COI	48
Tabla 11. Distribución y frecuencia de haplotipos para los genes mitocondriales ND5, 16S rRNA y COI detallado por departamento de colecta.	51
Tabla 12. Concordancia de los haplotipos peruanos encontrados para <i>A. mellifera</i> según la base de datos del GenBank	52
Tabla 13. Detalle de los índices de diversidad genética para el gen mitocondrial ND5.....	52
Tabla 14. Índices de diversidad genética para el marcador mitocondrial 16S rRNA. Se excluyeron las poblaciones con menos de dos haplotipos.....	52
Tabla 15. Detalle de índices moleculares para el marcador mitocondrial COI	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de castas en una colonia de abejas. A: abeja reina. B: zángano. C: obrera.	5
Figura 2. Distribución geográfica de las subespecies de <i>Apis mellifera</i> en el mundo. Las subespecies se encuentran clasificadas por color según su linaje (ver leyenda).....	11
Figura 3. Árbol consenso Neighbor Joining (NJ) representando las relaciones filogenéticas entre las diferentes subespecies de <i>A. mellifera</i> . El outgroup es una combinación de 3 secuencias externas diferentes. Las subespecies están agrupadas de acuerdo a los linajes que representan A, M, C y O.....	11
Figura 4. Evolución de la producción nacional y exportación de miel de abeja en toneladas (TN) durante los años 2001-2018. Fuente: Elaboración propia en función de datos de (FAOSTAT 2019; ITC-Trade Map 2019).....	16
Figura 5. Mapa del genoma circular de <i>Apis mellifera</i> (Crozier & Crozier 1993). Los genes encerrados con un círculo rojo son los que se emplearon para el desarrollo de esta tesis.	22
Figura 6. Mapa del Perú con la (A) distribución y (B) coordenadas geográficas de los puntos de colecta para las poblaciones de <i>A. mellifera</i> según las 11 ecorregiones propuestas por Antonio Brack (1986).....	28
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen mitocondrial ND5, tinción con bromuro de etidio. Los códigos de las muestras se indican en la parte superior de cada columna. LD: marcador de tamaño molecular (1 kb). Tamaño del producto: 822 pb. BL: control negativo.....	41
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen mitocondrial 16S rRNA, tinción con bromuro de etidio. Los códigos de las muestras se encuentran en la parte superior. LD: marcador de tamaño molecular (1 kb). Tamaño del producto: 964 pb. BL: control negativo.....	42
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen mitocondrial COI, tinción con bromuro de etidio. Los códigos de las muestras se encuentran en la parte superior. LD: marcador de tamaño molecular (1 kb). Tamaño del producto: 1028 pb. BL: control negativo.....	42
Figura 10. Representación de la calidad de los electroferogramas obtenidos en el estudio. El electroferograma corresponde a la secuencia sentido para el gen COI de la muestra AR4 (Valle de Colca - Arequipa). Electroferogramas similares fueron obtenidos también para los genes ND5 y 16S rRNA	43
Figura 11. Alineamiento múltiple del gen 16S rRNA de las muestras secuenciadas donde se indica los indels encontrados en las posiciones 591 y 592	48
Figura 12. Relaciones filogenéticas para el marcador ND5 inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 28 secuencias nucleotídicas peruanas y 16 referencias del GenBank (tamaño de 796 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo <i>Apis cerana</i>	56
Figura 13. Relaciones filogenéticas para el marcador ND5 inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de	

sustitución nucleotídica GTR obtenidos de JModelTest bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC). Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana* 57

Figura 14. Relaciones filogenéticas para el marcador 16S rRNA inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 29 secuencias nucleotídicas peruanas y 18 referencias del GenBank (tamaño de 929 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*. 58

Figura 15. Relaciones filogenéticas para el marcador 16S rRNA inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY + I obtenidos de JModelTest bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC). Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana* 59

Figura 16. Relaciones filogenéticas para el marcador COI inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 30 secuencias nucleotídicas peruanas y 16 referencias del GenBank (tamaño de 980 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana* 60

Figura 17. Relaciones filogenéticas para el marcador COI inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica GTR + I obtenidos de JModelTest bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC). Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana* 61

Figura 18. Relaciones filogenéticas para la matriz concatenada de los tres marcadores moleculares inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 30 secuencias nucleotídicas peruanas y 17 referencias del GenBank (tamaño de 2708 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana* 62

Figura 19. Relaciones filogenéticas para la matriz concatenada de los tres marcadores moleculares inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica TIM2 + G obtenidos con PartitionFinder. Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el

linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*..... 63

Figura 20. Haplotipos para el gen ND5. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (44 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos..... 66

Figura 21. Haplotipos para el gen 16S rRNA. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (47 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos..... 67

Figura 22. Haplotipos para el gen COI. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (46 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos..... 68

Figura 23. Haplotipos para la matriz concatenada de los 3 genes. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (46 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos. 69

RESUMEN

Apis mellifera es una especie de importancia ecológica y económica en el mundo, que fue introducida en nuestro país por los españoles. Actualmente, las poblaciones de este insecto han disminuido drásticamente, lo que se conoce como Síndrome de Colapso de Colmenas (CCD). En el Perú, una de las principales causas posibles del CCD es la disminución de la diversidad genética de esta especie resultado de la práctica empírica de cruzamiento de colmenas. Por tanto, es necesario un mayor conocimiento y caracterización de las razas que aquí habitan con la finalidad de optimizar dichas prácticas.

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la diversidad genética y las relaciones de parentesco en especímenes de *A. mellifera* recolectadas en 12 regiones del Perú a partir de los marcadores mitocondriales subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (ND5), ARN ribosomal 16S (16S rRNA) y subunidad I de la citocromo oxidasa C (COI). Los análisis filogenéticos de las secuencias por Neighbor Joining e Inferencia Bayesiana mostraron haplotipos peruanos emparentados con los linajes africano y europeo independientemente de la región geográfica. Asimismo, la red de haplotipos fue consistente con los árboles filogenéticos. El marcador COI presentó una mayor diversidad haplotípica (0.687 ± 0.064); sin embargo, se obtuvo una baja diversidad nucleotídica con los tres marcadores empleados. La prueba de neutralidad de Tajima no fue significativa para cada uno de los marcadores.

Palabras clave: *A. mellifera*, COI, ND5, 16S rRNA, filogenia, diversidad genética

ABSTRACT

Apis mellifera has ecological and economic importance in the world. This species was introduced in our country by the Spanish colonizers. Currently, populations of this insect have declined dramatically, which is known as Colony Collapse Syndrome (CCD). This event is not strange here, the lack of knowledge and characterization of the races have led to the gene introgression and decline of genetic diversity in apiaries.

Therefore, the main objective of this work was to evaluate the genetic diversity and phylogenetic relationships in *A. mellifera* races collected from 12 Peruvian sites, for the mitochondrial markers NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5), 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and cytochrome C oxidase subunit I (COI). Phylogenetic analyses of the sequences by Neighbor Joining and Bayesian Inference showed haplotypes of Peruvian bees related to African and European lineages regardless of geographic region. The haplotype network was consistent with the phylogenetic trees. The COI marker showed a greater haplotype diversity (0.687 ± 0.064), while low values of nucleotide diversity for the three markers. Tajima test was not significant with each of the markers.

Key words: *A. mellifera*, COI, ND5, 16S rRNA, phylogeny, genetic diversity

1. INTRODUCCIÓN

La abeja *Apis mellifera* (Linneo, 1758) es un insecto cosmopolita y eusocial distribuido naturalmente en Europa, África y parte de Asia que fue introducido en América y Oceanía con las expediciones europeas durante la colonización (Arias & Sheppard 1996).

Existen más de 26 razas o subespecies clasificadas en cinco linajes que comparten una historia evolutiva y un área geográfica determinada. Esta diversidad ha sido clave para su expansión a nivel mundial, permitiendo su adaptación a los diferentes climas y ecosistemas (Ruttner *et al.* 1978).

Las abejas son consideradas como uno de los principales polinizadores en el mundo, ya que polinizan aproximadamente un tercio de los campos agrícolas y mantienen la diversidad genética de la flora (Gallai *et al.* 2009; Potts *et al.* 2010). También, son clave para el desarrollo de la apicultura, actividad que tiene como objetivo la comercialización de productos derivados de la crianza de abejas en colmenas (colonias de abejas) artificiales, principalmente miel, producto al que se le atribuye propiedades antioxidantes y antibacteriales (bactericida y bacteriostática) (Pasupuleti *et al.* 2017; Combarros *et al.* 2018).

El incremento de la demanda de productos apícolas ha generado que los apicultores, busquen tener colmenas más manejables y productivas (comportamiento dócil y un alto forrajeo para alimentación) (Gallai *et al.* 2009; Contreras *et al.* 2013), por ello, movilizan sus colmenas de un lugar a otro (trashumancia) en tiempos de floración y crían y/o comercializan abejas reinas que consideran genéticamente potenciales para el desarrollo de una nueva colmena (Meixner *et al.* 2013; Martimianakis *et al.* 2011).

A pesar de estos esfuerzos por parte de los apicultores para generar nuevas líneas y colmenas de abejas en el mundo, principalmente Europa y Estados Unidos, la apicultura se enfrenta a una gran pérdida, fenómeno conocido como Síndrome de Colapso de Colmenas

(CCD, del inglés *Colony Collapse Disorder*). Las causas atribuibles al CCD son: el uso indiscriminado de insecticidas, la pérdida de áreas naturales, el aumento de monocultivos (como el de espárragos y palto en el Perú) y la trashumancia; así como la práctica de selección e inseminación artificial en las reinas. Todo ello trae como consecuencia la disminución en la diversidad genética por el constante apareamiento entre razas comerciales emparentadas (Oldroyd 2007; Gifford 2011; Ministerio de Agricultura 2011; Meixner *et al.* 2013; Bekic *et al.* 2014; López & Simone 2019). Otro efecto colateral de esta práctica es la generación de progenie con caracteres cada vez más similares, lo que dificulta la distinción entre las razas empleando marcadores morfológicos. Es por ello que en la actualidad se tiene que recurrir a los marcadores moleculares cuando se quiere estudiar la diversidad de las abejas ya que son más específicos que los morfológicos.

Los marcadores moleculares son macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos) con capacidad para detectar los polimorfismos en regiones específicas del ADN. Para estudios de diversidad intraespecífica o de relaciones de parentesco y ancestría, los más adecuados son los marcadores de ADN mitocondrial (mtDNA), ya que no tienen recombinación y son de herencia uniparental (línea materna) (Meixner *et al.* 2013).

Por otro lado, las razas de *A. mellifera* en el Perú incluyen la italiana, la carniola, que fueron introducidas por los españoles en el siglo XVI, y la africana, introducida más tarde en el siglo XX desde Brasil por una liberación accidental (Taylor & Orley 1977; Kent 1988; Nielsen *et al.* 1999).

Estas razas se han adaptado a nuestro territorio gracias a la variedad de ecosistemas y microclimas que tenemos; además de la disposición a una variedad florística (algarrobo, sapote, eucalipto, etc.) como fuente de alimento (Ministerio de Agricultura y Riego 2015). Esto califica al Perú como potencial productor y exportador de los productos derivados de las abejas; sin embargo, la producción apícola no ha alcanzado el desarrollo necesario para

abastecer a un mercado externo exigente, por lo contrario, solo complementa a la agricultura generando una nueva fuente de ingresos.

Por ello, para cambiar esta situación, en el 2015 se desarrolló un programa llamado Plan Nacional de Desarrollo Apícola (PNDA) que busca generar conocimientos (investigación) y tecnología que permitan aumentar la productividad de las abejas, garantizando la disponibilidad de miel y otros productos apícolas para abastecer a un mercado internacional más amplio, distinto al de Estados Unidos e Italia, quienes en la actualidad son nuestros principales importadores (Ministerio de Agricultura y Riego 2015).

Parte del éxito del PNDA depende de la generación de conocimiento básico que sirva de instrumento para la innovación y práctica de las nuevas técnicas apícolas, para que además de incrementar la productividad, permitan criar abejas sanas, dóciles y de buen forrajeo (alimentación).

Para ello, un aspecto importante es el de generar información básica sobre la filogenia y diversidad genética de *A. mellifera*. A la fecha, se desconoce si hay una o más variedades dependiendo de la ubicación geográfica. Asimismo, se desconoce la variación genética entre las colmenas, cuál es el flujo genético entre ellas o si existe introgresión de genes de otros linajes diferente al original (europeo). Para responder a estas interrogantes, en esta tesis se estudió la filogenia y la diversidad genética de *A. mellifera* en colmenas peruanas empleando los marcadores moleculares mitocondriales la subunidad I de la citocromo oxidasa C (COI), la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (ND5) y el ARN ribosomal 16S (16S rRNA).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción de *Apis mellifera*

Apis mellifera es un insecto eusocial del orden Hymenoptera descrita por primera vez por el científico y zoólogo sueco Carl Linnaeus en 1758. Comúnmente se le conoce como abeja, abeja europea o melífera. Las otras especies que conforman el género *Apis* son *A. dorsata*, *A. nigrocincta*, *A. andreniformis*, *A. florea*, *A. cerana* y *A. laboriosa*; sin embargo, *A. mellifera* es la más estudiada y conocida por su comportamiento y fisiología (Michener 2007; 1944; Ruttner 1988).

2.1.1 Descripción morfológica

Las abejas al igual que otros artrópodos presentan el cuerpo recubierto de una cutícula que se engrosa para originar una estructura de protección llamada exoesqueleto, cubierto por unos pelos o setas ramificadas (Chapman 1998).

En la cabeza se encuentran las antenas, órganos sensoriales que se parecen a unas pequeñas plumillas que le permiten detectar los sonidos en los alrededores. Otra estructura importante es el aparato bucal de tipo lamedor, con el que absorbe líquidos como el néctar de las flores (Chapman 1998; Ruttner 1988; Goodrich & Snodgrass 2006).

En el tórax se encuentran 3 pares de patas; el par posterior presenta un órgano llamado escopa, éste le permite acarrear el polen durante el forrajeo hacia la corbícula o canasta localizada en el mismo apéndice locomotor (Ruttner 1988).

La abeja reina tiene los últimos segmentos del abdomen modificados en un ovipositor, este órgano se asemeja a un canal o tubo por el que se depositan los huevos. Por otra parte, las obreras tienen el ovipositor en forma de un anzuelo con lancetas llamado aguijón, éste se encuentra conectado a unas glándulas productoras de veneno (apitoxina); por tanto, cuando las abejas se sienten amenazadas inyectan este aguijón sobre su atacante y por una contracción muscular-abdominal secreta dicho veneno desgarrando parte de su abdomen y produciendo su propia muerte (Seeley 1995; Ruttner 1988; Michener 2007).

Es posible distinguir morfológicamente las tres castas en una colmena. La reina es la más grande, tiene una estructura esclerotizada en el tórax llamada *scutum* o escudo muy visible y su abdomen es alargado. Las obreras representan el 90% dentro de la colonia y al igual que la reina su abdomen es alargado y termina en punta ya que protege al aguijón; en tamaño es la más pequeña de la colmena. Por último, están los machos o zánganos que tienen el abdomen redondeado, el tórax más ancho y su coloración es más oscura que las otras dos castas (Michener 2007) (Figura 1).

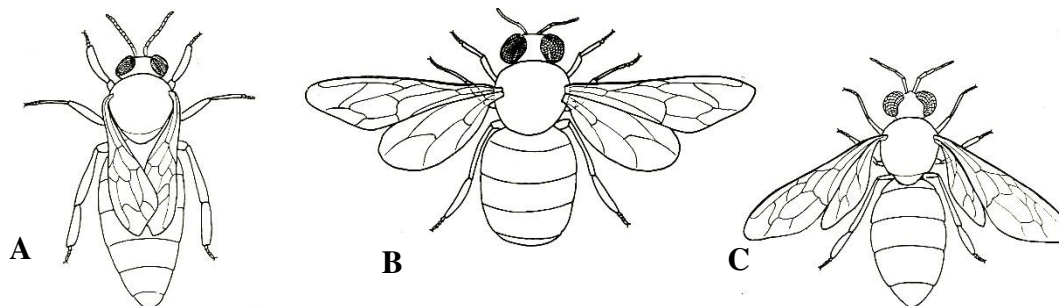


Figura 1. Tipos de castas en una colonia de abejas. A: abeja reina. B: zángano. C: obrera.

Fuente: Tomado de <http://www.biology-resources.com/insects-01.html>

2.1.2 Estructura social

Como se mencionó en líneas anteriores, las abejas simulan una sociedad que en conjunto se denomina colmena o colonia. Ésta se divide en tres castas (agrupación de individuos), cada una con actividades específicas:

- a) **La reina:** Es la única hembra fértil de la colmena; es decir, puede producir huevos fertilizados que darán origen a las obreras, pero también, producir huevos no fertilizados que originarán a los machos (zánganos), según las necesidades de la colmena. El tiempo de vida de una reina es de 1 o 3 años aproximadamente (Nates 2011).
- b) **Las obreras:** Son abejas hembras al igual que la reina, pero con un sistema reproductor vestigial o no desarrollado que les permite producir huevos no

fertilizados (machos), esto por un mecanismo llamado partenogénesis. En una colmena se puede encontrar entre 20 000 y 80 000 obreras, quienes cumplen diversas funciones que ayudan a mantener la integridad y salud de la misma, Sus funciones son: la construcción de los panales, defensa y limpieza de la colmena, el cuidado y la alimentación de las crías, la búsqueda del alimento (forrajeo), la producción de la miel y jalea real, entre otras (Mendizabal 2005)

- c) **Los zánganos:** Son los machos de la colmena, su única función es fecundar a la reina durante el vuelo nupcial. Su tiempo de vida natural es de 50 días aproximadamente (Jean-Prost *et al.* 2007).

2.1.3 Reproducción

En una colmena la reina es la única que copula con los machos. Cuando las condiciones de alimento son favorables, ésta emprende un vuelo nupcial en el que se aparea con un promedio de 10 zánganos que pueden ser de la misma colmena o de otras, almacenando los espermatozoides en un órgano llamado espermateca. La copulación puede darse entre individuos de diferente raza; por ejemplo, en un caso extremo, una reina italiana con un macho africano (Mendizabal 2005).

La reina puede poner huevos no fecundados según la disposición del alimento y la estación del año. Por ejemplo, en primavera la mayoría de los huevos son fecundados ya que se necesitan obreras para el forrajeo. Si la reina solo pone huevos no fecundados, las obreras la matan y crían una nueva (Mendizabal 2005).

Desde mediados del siglo XIX se conoce que las abejas son capaces de desarrollarse a partir de huevos fertilizados y no fertilizados. Este sistema se conoce como haplodiploide; es decir, un huevo no fértil tiene la mitad del número cromosómico que pertenece a la madre y genera machos (haploide, $n = 16$), mientras que un huevo fertilizado es diploide ($2n = 32$) en la que se hereda información genética de ambos padres y es típico de las hembras (reina

y obreras). Por tanto, dos tipos de reproducción estarían involucrados, la llamada partenogénica y la sexual, respectivamente. Con la primera se originan machos y con la segunda, hembras (reina y obreras).

Ya en el siglo XX, Otto Mackensen (*apud* Kaskinova & Nikolenko 2017) formuló la existencia de un gen X multialélico que determinaba el sexo en las abejas, esto al observar una muerte excesiva de las crías (solo zánganos) en colmenas sanas. Desde entonces, al confirmarse empíricamente esta hipótesis, se conoce que existe un mecanismo genético llamado determinación del sexo complementario (*csd*, *complementary sex determiner*, por sus siglas en inglés) que determina el sexo en las abejas (Kaskinova & Nikolenko 2017). Con esto se asume que las hembras son heterocigotas para el gen *csd*, mientras que los machos, hemicigotos (haploides) para el mismo. Sin embargo, bajo este sistema también pueden desarrollarse machos homocigotos (diploides) “anormales”, los cuales son detectados y devorados por las obreras, este fenómeno se conoce como “*shotgun brood*” (Heimpel & de Boer 2008; Kaskinova & Nikolenko 2017).

2.1.4 Ciclo de vida

Las abejas son insectos holometábolos, es decir, tienen una metamorfosis completa con estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Estas etapas tienen diferente tiempo de duración entre cada casta (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempo de desarrollo de un embrión por casta después de la puesta del huevo.

Estadios	Duración de estadio (días)		
	Reina	Obrera	Zángano
Huevo	3 días	3 días	3 días
Larva	6 días	7-8 días	8-9 días
Pupa	6-7 días	10-11 días	13 días
TOTAL	15-16 días	21-22 días	24-25 días

La alimentación es diferente en cada casta y solo se da en el estadio de larva. Durante los dos primeros días en esta etapa, todas las crías, sin excepción, reciben la jalea real como alimento. Al tercer día, la alimentación ya se diferencia entre obreras, zánganos y reina. Los dos primeros son alimentados con una papilla de miel y polen, mientras que la última, continúa consumiendo jalea real (Mendizabal 2005).

La jalea real es una sustancia blanquecina y gelatinosa secretada por las glándulas hipofaríngeas de las obreras jóvenes. Consiste en una mezcla de agua, azúcares, proteínas, vitaminas (B5, niacina), y sales minerales (Xue *et al.* 1992). Se le atribuye la presencia de compuestos activos como los flavonoides que tienen propiedades antioxidantes, antivirales, antifúngicas, entre otras (Pasupuleti *et al.* 2017).

A diferencia de la miel, la jalea real tiene una proteína denominada royalactina, esta es responsable de la expresión de la hormona juvenil necesaria para que se desarrolle el sistema reproductor de las abejas y, además, estimula la producción de la hormona de crecimiento en las mismas, por ello, la reina es la más grande (Kamakura 2011).

En conclusión, el desarrollo de una abeja depende de muchos factores además de los genéticos, como el tipo de alimento y los niveles hormonales.

2.2 Distribución de linajes y razas de *Apis mellifera*

Apis mellifera es una especie cosmopolita que actualmente se distribuye en muchos países a nivel mundial; sin embargo, su origen se encuentra en el viejo mundo, región a partir de la cual fue introducida al continente americano a finales del siglo XVI, específicamente con el establecimiento de las colonias inglesas en Virginia y Massachusetts (Estados Unidos); con el avance de la colonización, fueron introducidas en Sudamérica en el siglo XIX, pasando primero por Centroamérica (Kent 1988).

Esta especie presenta una compleja diversidad intraespecífica, por lo que con el tiempo ha desarrollado diferentes patrones morfológicos y etológicos según la adaptación a su hábitat;

es así que en un principio los taxónomos designaron nombres según su lugar de origen, esto es lo que se conoce como “raza geográfica” o “subespecie”.

En 1906 H. von Buttel – Reepen (*apud* Ruttner 1988) estableció un sistema trinomial de nomenclatura en el que asignaba una tercera denominación después del nombre científico de la especie, éste haciendo referencia a su raza geográfica. Por ejemplo, tenemos la denominación de *A. mellifera iberica*, la cual identifica poblaciones de abejas que se encuentran en la Península Ibérica. Sin embargo, este trabajo solo consideró dos caracteres morfológicos, el color y el tamaño del abdomen, causando confusión al distinguir razas de abejas que compartían patrones similares de coloración (Kent 1988).

Es así que dos décadas después Alpatov y Goetze implementaron la medición de estructuras corporales como las patas, alas, tórax, aparato bucal, entre otros; además, introdujeron nuevos indicadores morfológicos como el patrón de venación en las alas (Kent 1988).

Adicionalmente, Ruttner *et al.* (1978) realizaron un análisis multivariado de componentes principales en el que compararon datos biométricos de 33 patrones morfológicos frente a datos de distribución geográfica por cada individuo (más de 400 individuos de la mayoría de países del viejo mundo), llegando a la conclusión de que varias razas compartían patrones morfológicos similares, así como también su distribución geográfica e historia; por ello, agruparon estas razas en tres grandes linajes:

Linaje A que comprende las razas (subespecies) de África: *A. m. lamarckii*, *A. m. yemenitica*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor* y *A. m. capensis*.

Linaje C que incluye las subespecies del sudeste europeo: *A. m. ligustica* (Italia), *A. m. sicula* (Sicilia), *A. m. carnica* (Yugoslavia), *A. m. macedonica* (Norte de Grecia y Bulgaria), *A. m. cecropia* (Sur de Grecia).

Linaje M que agrupa las subespecies del norte de Europa (*A. m. mellifera*), España y Portugal (*A. m. iberica*) y del norte de África (*A. m. intermissa*, *A. m. sahariensis* y *A. m. major*). Asimismo, en 1988 encontró el nuevo linaje O que agrupa subespecies del Cercano Oriente como *A. m. anatoliaca* (Turquía), *A. m. adami* (Creta), *A. m. cypria* (Chipre), *A. m. syriaca* (Siria), *A. m. meda*, *A. m. caucasia* y *A. m. armeniaca* (Armenia) (Ruttner 1988).

Los tres primeros linajes han sido corroborados con análisis moleculares basados en polimorfismos a nivel del ADN nuclear y mitocondrial. Un poco más tarde Franck *et al.* (2000) reforzaron la agrupación del linaje O con un estudio basado en la información obtenida de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y microsatélites (STR, *Short Tandem Repeat*).

En el 2001, los mismos autores estudiaron la diversidad genética de las abejas africanas evaluando una región intergénica entre el gen de las subunidades I y II de la citocromo oxidasa C (COI-COII) y encontraron un nuevo linaje en la zona noreste de África al que denominaron linaje Y. En este nuevo grupo, que se ubica en Etiopía, hay una raza de abejas llamada *A. mellifera yemenitica* (Franck *et al.* 2001).

En nuestro continente la situación es diferente, ya que la mayoría de poblaciones presentes son las domesticadas por el sector apícola. Por historia se conoce que las razas europeas fueron las que ingresaron con los colonizadores en el siglo XVI (Kent 1988), mientras que en 1956 en Brasil un descuido humano provocó la huida de enjambres introducidos de abejas africanas, *A. m. adansonii* (las más agresivas y territoriales), las que se dispersaron rápidamente en el continente desde el sur hacia el norte (Taylor & Orley 1977; Kent 1988). El Perú tiene diversas razas de *A. mellifera* que se han adaptado a los diferentes hábitats y condiciones climáticas, lo que ha conllevado a que se distribuyan en todas las regiones sin excepción. Las primeras razas que ingresaron a nuestro país fueron: la italiana (*A. m. ligustica*), la europea (*A. m. mellifera*) y la carniola (*A. m. carnica*). Posteriormente, con la introducción de razas africanas al continente, se reportó en 1974 la presencia de éstas en la ciudad de Pucallpa (Ucayali), específicamente fueron *A. m. adansonii* y *A. m. scutellata*. Actualmente, en nuestro país existe una raza llamada criolla que es producto del cruzamiento de la raza europea y africana (Ministerio de Agricultura y Riego 2015; Ministerio de Agricultura 2011; Kent 1988).

2.3 Importancia ecológica y económica

Las abejas tienen un papel importante dentro de la agricultura y la economía mundial. Son responsables de la polinización del 30% de los campos de cultivo industrializados en el mundo, lo que en valor económico equivale aproximadamente a 170 millones de USD (Klein *et al.* 2007; Gallai *et al.* 2009) y del 80% de las plantas silvestres que dependen de este servicio para la producción de frutos y semillas en general, con lo que se mantiene la diversidad genética de la flora (Potts *et al.* 2010).

Para la polinización de las flores, las abejas obreras desarrollan una actividad llamada pecoreo o forrajeo que consiste en la búsqueda de recursos para el mantenimiento de la

colmena, como el néctar, polen, resinas y agua. Con ello se puede evaluar y cuantificar la presencia de pesticidas en los campos de cultivo (Abou 2014).

Como resultado del impacto positivo que tienen las abejas en los campos agrícolas, muchas personas aficionadas o calificadas han desarrollado metodologías para manejar colmenas de abejas de forma tecnificada y/o hasta industrializada. Dicha actividad se conoce como apicultura y es desarrollada con la finalidad de aprovechar al máximo los recursos adicionales que las abejas ofrecen tales como: la miel, propóleo, jalea real y pan de abeja a las que se les atribuye propiedades nutritivas; la cera que se emplea en la cosmética, y la apitoxina o veneno de abeja que se utiliza como tratamiento para enfermedades virales, degenerativas y reumáticas en la medicina tradicional (Hilmi *et al.* 2011).

La apicultura es una actividad muy desarrollada en el mundo que está orientada sobre todo a la producción de miel. Los principales países productores de miel en el mercado internacional para el 2018, según la base estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, son China (457 mil toneladas), Turquía (114 mil toneladas), Argentina (79 mil toneladas) y Estados Unidos (69 mil toneladas) lo que va de la mano con el número de colmenas presentes en dichos países (FAOSTAT 2019). Cabe mencionar que Estados Unidos ha experimentado una notable pérdida de colmenas (13%) durante los últimos años, la cual puede atribuirse al denominado Síndrome de Colapso de las Colmenas (CCD) que se explicará más adelante (Sanchez *et al.* 2018).

En cuanto a las exportaciones de miel, China es el principal exportador en el mundo junto con Argentina, Alemania y Nueva Zelanda, quienes exportan un volumen equivalente a 135 millones de USD (Sanchez *et al.* 2018).

2.4 Apicultura en el Perú

El Perú por su ubicación geográfica contempla una variedad de condiciones favorables (climáticas y ambientales) para el desarrollo de la actividad apícola (Gupta *et al.* 2014).

Estas no solo permiten la adaptación de las abejas a los diferentes ambientes, sino que son propicias para el desarrollo de diferentes cultivos ya sean autóctonos o introducidos, sirviendo como materia prima para la producción de una miel multifloral (Zevallos & Pérez 1990).

Esta actividad, en su mayoría, es realizada como un complemento de la agricultura y genera ingresos adicionales, sobre todo en zonas rurales donde las personas que la practican no tienen un alto grado de instrucción o capacitación técnica (Gallai *et al.* 2009; Ministerio de Agricultura y Riego 2015).

Según el IV Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO) realizado en el 2012, el Perú cuenta con 252,329 colmenas instaladas en todo el territorio, de las cuales el 85% están dedicadas a la producción de miel. Asimismo, tenemos 41,327 apicultores dedicados a esta actividad, considerando que cada uno tiene un promedio de cinco a diez colmenas como mínimo. De acuerdo a ello, las regiones que tienen la mayor cantidad de colmenas productivas y por tanto mayor producción de miel son Cusco (11%), La Libertad (10%), Junín (9%), Lima (8%) y Apurímac (7%) (Tabla 2) (Ministerio de Agricultura y Riego 2015). El porcentaje de colmenas restantes se encuentra distribuido en todo el territorio nacional.

Los apicultores en el Perú son independientes, pero se encuentran agrupados a nivel departamental y/o regional para el intercambio de conocimientos y tecnologías. Existen dos grandes grupos apícolas que integran a las asociaciones nacionales, locales y empresas: la Confederación Peruana de Apicultores (COPEAPI) y la Federación Peruana de Apicultores (FEPEAPI) quienes en conjunto realizan esfuerzos para el desarrollo de esta industria de forma organizada, planificada, sostenible y competitiva.

Por otro lado, la apicultura peruana (tradicional y semi-tecnificada) tiene el potencial para enfrentarse al mercado internacional con la exportación de miel de abeja. Sin embargo, carece de la tecnología que le permita tener una producción a mayor escala para cumplir

con los volúmenes de miel (TN) que exige dicho mercado (Zevallos & Pérez 1990; Ministerio de Agricultura y Riego 2015). Esto se puede apreciar con la caída en la exportación de miel durante los últimos diez años, en los que a pesar de un aumento en la producción nacional no se llega a cumplir con los estándares requeridos para una mayor exportación y gran parte se queda para el consumo interno (Figura 4). Cabe mencionar que nuestras exportaciones están destinadas principalmente a Estados Unidos y Malasia (ITC-Trade Map 2019).

Es así que, el Ministerio de Agricultura y Riego junto con los apicultores peruanos presentaron en el 2015 un Plan Nacional de Desarrollo Apícola (PNDA) que se extiende hasta el 2025. Este PNDA tiene como objetivo principal fomentar la competitividad de la producción del sector apícola a través del mejoramiento en la calidad e inocuidad de los productos, así como del desarrollo tecnológico y científico. El monitoreo y ejecución de este PNDA se encuentra a cargo de la denominada Mesa Apícola Nacional, quien se encuentra formada por apicultores pertenecientes a la COPEAPI y diversas autoridades de los ministerios involucrados.

Tabla 2. Colmenas en producción por departamento y en porcentaje de producción a nivel nacional para el año 2012.

Departamento	Colmenas productivas	% producción
Cusco	23 426	11
La Libertad	21 136	10
Junín	19 874	9
Lima	16 805	8
Apurímac	15 614	7
Cajamarca	15 491	7
Ancash	13 926	7
Ayacucho	13 050	6
Piura	11 809	6
Lambayeque	9 470	4

Pasco	8 959	4
Huancavelica	8 129	4
Huánuco	7 077	3
Ica	6 790	3
San Martín	6 071	3
Arequipa	5 894	3
Amazonas	3 946	2
Moquegua	1 540	1
Tacna	1 531	1
Loreto	1 373	1
Ucayali	1 015	1
Puno	737	0.3
Tumbes	367	0.2
Madre de Dios	241	0.1
Callao	5	0.002
Total	214276	100

Fuente: Elaboración en función de los datos del IV Censo Nacional Agropecuario mostrados en el Plan Nacional de Desarrollo Apícola (Ministerio de Agricultura y Riego 2015)

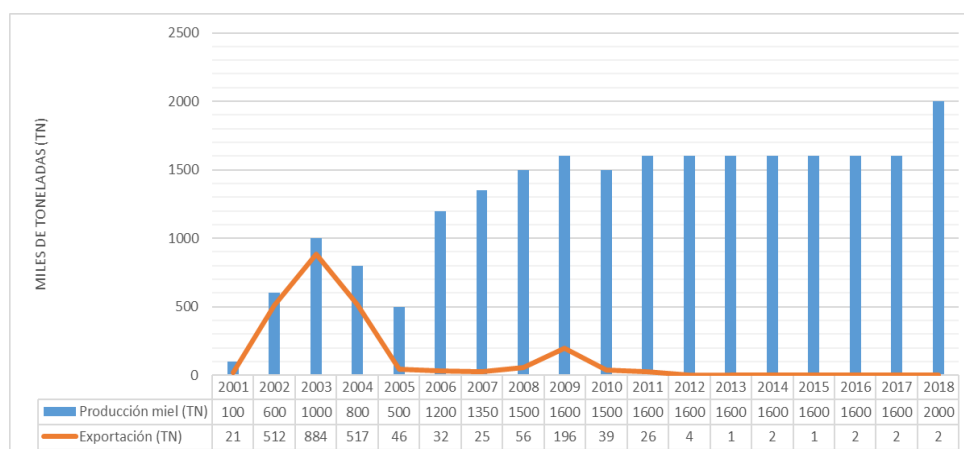


Figura 4. Evolución de la producción nacional y exportación de miel de abeja en toneladas (TN) durante los años 2001-2018.

Fuente: Elaboración propia en función de datos de (FAOSTAT 2019; ITC-Trade Map 2019).

Dentro de las medidas que se deben desarrollar para el cumplimiento del PNDA están el manejo y control de plagas y enfermedades de las colmenas, la selección y mejoramiento genético de las reinas, así como una mayor tecnificación para la crianza y fecundación de las mismas (Ministerio de Agricultura y Riego 2015; Contreras *et al.* 2013; Mercado 2014). Todo ello sería más accesible con un conocimiento de las razas genéticas de abejas presentes en nuestro país, ya que dependiendo de ello se puede anticipar el impacto de las plagas y enfermedades en las colmenas (africanas son más sanas), la resistencia a insecticidas y el nivel de producción de las mismas.

2.5 Situación actual

En la actualidad, como sabemos, *A. mellifera* es una de las especies de animales más domesticadas por el hombre con dos fines, el primero, orientado a la polinización de grandes campos de cultivo y el segundo, destinado a la producción de derivados como la miel, propóleo y cera (Gallai *et al.* 2009; Contreras *et al.* 2013; Ministerio de Agricultura y Riego 2015; Sanchez *et al.* 2018).

Sin embargo, esta demanda de la especie ha conllevado a que los apicultores realicen selecciones de razas de manera empírica y no regularizada, es decir, buscan generar híbridos más productivos y dóciles a la vez (Murray *et al.* 2009; Potts *et al.* 2010).

El término “más productivos” se refiere a aquellas razas que tienen una buena búsqueda de los alimentos (forrajeo) y que por tanto producen la miel y otros derivados en grandes cantidades (kilogramos por colmena). Se dice que la raza que cumple con los requisitos son las africanas pero su comportamiento territorial (agresivo) no permite su adecuado manejo (Strauss *et al.* 2013). Por otro lado, la raza europea se caracteriza por su docilidad al trato humano; sin embargo, suelen ser más susceptibles a las enfermedades (Sammataro & Avitabile 1978).

Es por todo ello, que los apicultores intervienen en el apareamiento natural de las abejas buscando generar híbridos entre ambas razas que cumplan las características antes mencionadas. Esta práctica, sumada a la transferencia de patógenos y parásitos, la pérdida de forraje y hábitat de anidamiento, la presencia de especies exóticas invasoras, la falta de control de plagas y los impactos antropogénicos como el uso de agroquímicos e insecticidas, han traído como consecuencia la pérdida de poblaciones silvestres y manejadas en un fenómeno que se conoce como Síndrome de Colapso de Colmenas (CCD, *Colony collapse disorder*) (Gifford 2011), siendo los países europeos y norteamericanos los más afectados.

Los apicultores tienen un conocimiento empírico de las razas de abejas ya que se guían de los caracteres morfológicos para diferenciarlas; sin embargo, hoy en día estos marcadores no distinguen con exactitud a los individuos genéticamente cercanos como es el caso de las razas o subespecies. Por ello, para que los apicultores puedan efectuar los cruces apropiados entre las diferentes razas y, además, conocer la diversidad específica entre ellas, es recomendable emplear los marcadores moleculares.

2.6 Marcadores moleculares (MM)

Los marcadores moleculares son segmentos cortos de ADN que evidencian cambios nucleotídicos en éste a través del tiempo y que pueden ser detectados por técnicas de laboratorio. Los MMs se ubican en los cromosomas de los individuos en una posición específica llamada “locus” (plural “loci”) (Avisé 2004) y presentan las siguientes ventajas: alta tasa de variación (polimorfismo), se transmiten por herencia mendeliana, no son afectados por el medio ambiente, y pueden ser estudiados en el laboratorio.

Con el tiempo, los marcadores moleculares fueron reforzando y/o reemplazando la información obtenida a partir de marcadores morfológicos, ya que estos últimos tenían caracteres limitados que dificultaban la distinción entre un individuo y otro.

Hoy en día, los MMs se han convertido en la herramienta fundamental para diversos estudios, ya sea de filogenia, diversidad genética, estructura y dinámica poblacional, mapeo genético, encontrar genes de resistencia a insecticidas e identificar patógenos en los insectos (Singh *et al.* 2017).

2.6.1 Marcadores moleculares de proteínas

2.6.1.1 Alozimas

Las alozimas son proteínas que representan formas alternativas de una enzima, es decir, son codificadas por diferentes alelos de un mismo gen, pero con funciones enzimáticas similares (Markert & Moller 1959). Mediante la electroforesis es posible detectar las variaciones que existen en los genes que codifican para estas enzimas.

Estos fueron los primeros marcadores moleculares que se emplearon para estudiar las relaciones filogenéticas y la variabilidad entre las poblaciones tanto del género *Apis* como de la especie *A. mellifera* y sus razas (Sheppard & Berlocher 1989; Nunamaker & Wilson 1981; Badino *et al.* 1988; Arias *et al.* 2006).

En un comienzo, la alozima más estudiada fue la malato deshidrogenasa (MDH) que permitió evaluar la introgresión de los genes africanos en las colmenas de Brasil, siendo homocigotas para las primeras y heterocigotas para las híbridas (africanas - europeas). Con esto se concluyó que más del 90% de esta población brasilera había tenido contacto con la raza africana que se liberó en la década de los 50 (Nunamaker & Wilson 1981).

Otras proteínas como la fosfoglucomutasa (PGM), la enzima málica (ME), la hexoquinasa (HK), y la esterasa (Est), han permitido determinar la diversidad de abejas en países del viejo y nuevo mundo (Badino *et al.* 1988; Meixner *et al.* 1994; Nielsen *et al.* 1994; Smith & Glenn 1995).

A diferencia de los marcadores moleculares, las alozimas, al ser proteínas presentan tan solo un tercio de la variación presente en el gen y son más conservados; por lo tanto, la

variación que se encuentra en una población es muy pequeña o no detectable (Nielsen *et al.* 1994; Patricia *et al.* 1998; Singh *et al.* 2017).

2.6.2 Marcadores moleculares de ADN

2.6.2.1 Marcadores de ADN nuclear

2.6.2.1.1 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP

La técnica RFLP permite detectar diferencias entre los fragmentos de ADN de diferentes organismos. Éstos son generados por la acción de las enzimas de restricción (endonucleasas) que identifican y escinden las secuencias específicas de nucleótidos del ADN. Para estudiarlos se requiere de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida de una digestión con las enzimas de restricción, una electroforesis en gel y una transferencia e hibridación con sondas marcadas (Eguiarte *et al.* 2007).

Han sido empleados para evaluar la hibridación e introgresión de genes africanos en poblaciones de abejas en Norteamérica y Sudamérica, con lo que se concluyó que la africanización se expandió de sur a norte vía paterna (Hall 1990); también, para estudiar la variación y divergencia nucleotídica entre las razas (Bouga *et al.* 2005).

2.6.2.1.2 Microsatélites o STR

Los microsatélites también llamados STR (repeticiones simples en tándem) o SSR (repeticiones de secuencia única) son secuencias de una a seis pb repetidas de forma consecutiva o en tándem dentro de las regiones no codificantes del ADN (visto en González 2003).

Al igual que otros marcadores moleculares, los microsatélites tienen una alta tasa de mutación y son muy polimórficos, lo que sumado a su naturaleza codominante (Chambers & Macavoy 2000) permite que sean utilizados en genética para: a) hallar las relaciones de parentesco, en este caso entre las razas y especies de abejas (Neumann *et al.* 1999), b) evaluar la diversidad genética intraespecífica (subespecies de *A. mellifera*) (Estoup *et al.*

1995; Dall-Olio *et al.* 2007; Nikolova 2011; Ostroverkhova *et al.* 2016) e interespecífica, c) la hibridación e introgresión de genes (Parejo *et al.* 2018) y d) el comportamiento (Chaline *et al.* 2002).

2.6.2.1.3 Polimorfismos de un solo nucleótido o SNP

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) son un tipo de marcador nuclear que afecta a una sola base nitrogenada o nucleótido del ADN. Estos polimorfismos tienen una amplia distribución en el genoma y generalmente se encuentran en regiones no codificantes. Dichas mutaciones influyen sobre los niveles de expresión de algunos genes y juegan un rol determinante para el desarrollo o resistencia a ciertas patologías (Behura *et al.* 2006; Holloway *et al.* 2012)

Con este marcador se ha estudiado la historia evolutiva de *Apis mellifera* (Wallberg *et al.* 2014; Cridland *et al.* 2017) así como la variación genética, con lo que se ha descartado un efecto de cuello de botella entre las poblaciones domesticadas (Wallberg *et al.* 2014). También, se ha encontrado SNPs asociados a la resistencia contra la ascosferosis, una enfermedad producida por el hongo *Ascosphaera apis* que ocasiona la muerte de las larvas infectadas (Holloway *et al.* 2012).

2.6.2.2 Marcadores de ADN mitocondrial (mtDNA)

El ADN mitocondrial (mtDNA) de *A. mellifera* es una molécula circular de aproximadamente 16,343 pares de bases (pb) y con una composición de bases nitrogenadas de 43.2% A, 41.7% T, 5.5% G y 9.6% C; también, tiene 13 genes codificantes de proteínas, dos subunidades de ADN ribosomal (12S y 16S), 22 genes de ARN de transferencia, una región no codificante que contiene el origen de replicación a través de la cual el núcleo controla la replicación, transcripción y traducción mitocondrial (Figura 5) (Crozier & Crozier 1993; Avise 2009; Meixner *et al.* 2013).

Se transmite solo por vía materna. Dentro de sus características, están su alto porcentaje de ADN codificante, la carencia de intrones, la ausencia de recombinación; así como su elevada y rápida tasa de evolución respecto al ADN nuclear. Estas últimas son producto del deficiente mecanismo de reparación de daño del ADN, la falta de histonas y la exposición permanente de la molécula a los radicales libres (Awise 2009).

Estos factores son los que posicionan al mtDNA como un buen candidato para estudiar las relaciones filogenéticas o filogeográficas en las poblaciones, la diversidad molecular, la estructura poblacional y los patrones de hibridación entre las especies y subespecies.

Otra de las características del mtDNA que es importante tener en cuenta cuando se emplean sus genes como marcadores moleculares es su naturaleza poliploide. A diferencia del núcleo de una célula, la mitocondria tiene muchas más copias de ADN (pueden ser más de 1000), estas pueden transmitirse a la descendencia bajo dos condiciones: homoplasmia y heteroplasmia. La primera se refiere a que una célula hija hereda copias iguales de mtDNA de la madre (lo más común). Mientras que, la heteroplasmia implica una herencia de 2 o más variantes del mtDNA (dos haplotipos) (Wonnapijit et al. 2008; Awise 2009).



Figura 5. Mapa del genoma circular de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993). Los genes encerrados con un círculo rojo son los que se emplearon para el desarrollo de esta tesis.

2.6.2.2.1 Citocromo oxidasa C

El gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa C (COI) es uno de los genes mitocondriales más empleados para estudios genéticos. Al tener una alta tasa de mutación y estar altamente conservado entre los organismos animales, ha sido elegido como la secuencia estándar para la identificación taxonómica de las especies según el sistema *DNA Barcoding* o Código de barras del ADN propuesto por Paul Hebert en el 2003 (Hebert *et al.* 2003). Su tamaño en *A. mellifera* es de 1566 pb.

El COI y la subunidad II de la citocromo oxidasa C (COII) fueron los primeros marcadores mitocondriales que se estudiaron en *A. mellifera* y han permitido inferir la historia evolutiva y las relaciones filogenéticas en la especie y subespecies, la variabilidad genética intraespecífica (Arias & Sheppard 1996; De-Rúa 1999); además ha corroborado la clasificación de los linajes propuestos en un inicio por los estudios morfométricos (Garnery *et al.* 1992).

2.6.2.2.2 ND5

La subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (ND5), con un tamaño de 1665 pb es otro de los marcadores mitocondriales empleados para estudios genéticos. Martimianakis *et al.* (2011) estudiaron la variación de ND5 en poblaciones europeas para determinar las relaciones filogenéticas entre las subespecies de la región, encontrando 8 haplotipos europeos diferentes, concluyendo además que *A. m. ligustica* forma un clado más aislado, siendo una mezcla entre el linaje europeo y del medio oriente.

2.6.2.2.3 16S rRNA

Este gen de 1371 pb ha sido empleado como marcador para conocer la taxonomía y clasificación de razas, así como, la diversidad y filogenia molecular en el género *Apis* (Engel & Schultz 1997) y entre las diferentes razas (Estoup *et al.* 1995; Nielsen *et al.* 1999). Es así que se ha encontrado una similitud de este gen del 72% entre dos razas de abejas (*A.*

m. carnica y *A. m. jementica*) y diferentes artrópodos, y una diversidad intraespecífica que varía desde 0.1 a 23.8% (Alajmi *et al.* 2019).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los marcadores mitocondriales COI, ND5 y 16S rRNA permiten determinar la variabilidad genética y las relaciones de parentesco en poblaciones peruanas de *Apis mellifera* colectadas en el Perú.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética y las relaciones evolutivas de las subespecies de *Apis mellifera* (Linneo, 1758) con tres marcadores de ADN mitocondrial en el Perú.

3.2.2 Objetivos específicos

- Obtener secuencias nucleotídicas de tres genes mitocondriales COI, ND5 y 16S rRNA a partir de muestras de abejas de colmenas fijas procedentes de 12 regiones del Perú.
- Evaluar la diversidad genética de *Apis mellifera* en poblaciones peruanas.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones peruanas de *Apis mellifera*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos desarrollados para esta tesis (procesamiento y análisis molecular de las muestras) se realizaron en la Unidad de Virología de la Unidad de Epidemiología Molecular (UEM) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

4.1 Zona de estudio

Para este estudio se consideraron las regiones con mayor producción de miel como Cusco, La Libertad y Junín. En total se estudiaron muestras de 21 localidades diferentes y distribuidas heterogéneamente en 12 regiones del Perú: Apurímac, Arequipa, Cusco, Huánuco, Ica, Junín, La Libertad, Lambayeque, Lima, Loreto, Piura y San Martín (Figura 6).

4.2 Colecta de abejas

Las abejas fueron recolectadas durante los años 2018 y 2019 con la cooperación de los apicultores independientes que integran las dos grandes organizaciones apícolas en el Perú, COPEAPI y FEPEAPI.

Por la logística, la colecta fue realizada por los apicultores de las diferentes regiones que mostraron interés en conocer la diversidad genética entre las colmenas del Perú, ellos enviaron muestras de sus colmenas para estudiarlas.

Los criterios para la inclusión de muestras fueron los siguientes:

- Colmenas fijas en el lugar de muestreo, es decir, que no hayan sido movilizadas por el hombre de una región a otra (trashumancia) en un tiempo menor de doce meses.
- Si se colectan especímenes de más de una colmena en el mismo apiario, estas deben tener un radio de separación mayor a 25 km.

En total se recolectaron 451 abejas obreras de 12 regiones del Perú (Tabla 3). Sin embargo, para el análisis solo se empleó una abeja de cada colmena ya que todas son genéticamente idénticas entre sí.

La colección de las muestras estuvo acompañada del llenado de una ficha con datos de ubicación y antigüedad de las colmenas (Anexo 10.1). Las muestras se almacenaron en un tubo de plástico de 15 mL con alcohol al 96% y se preservaron a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

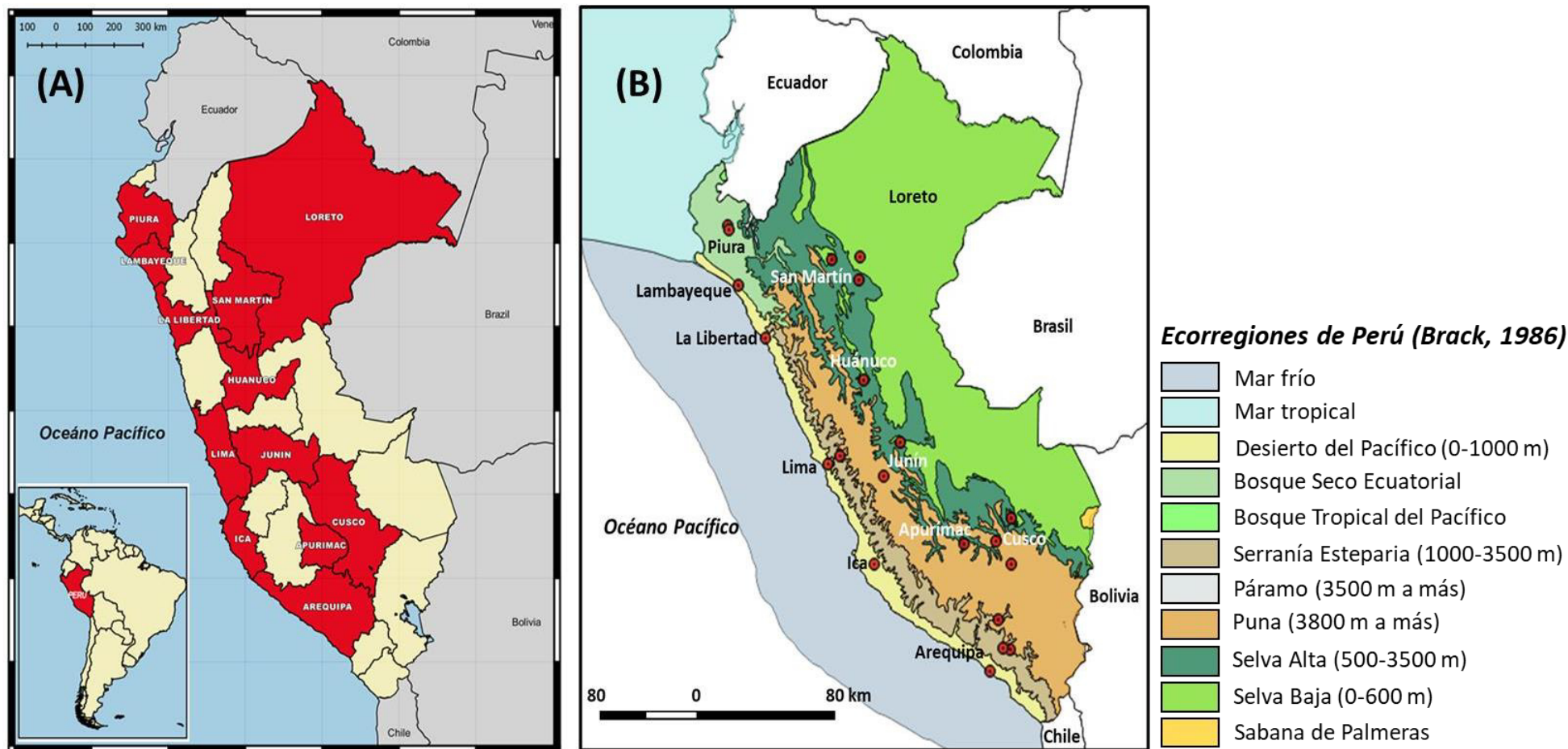


Figura 6. Mapa del Perú con la (A) distribución y (B) coordenadas geográficas de los puntos de colecta para las poblaciones de *A. mellifera* según las 11 ecorregiones propuestas por Antonio Brack (1986)

Tabla 3. Localidades de muestreo con coordenadas geográficas. Se muestra además el código asignado para cada localidad (ID), el cual fue empleado para asignar la identificación de cada muestra.

Departamento	ID	Localidad	Coordenadas		Altitud (m.s.n.m.)	N° de colmenas	Individuos colectados	N° Individuos estudiados
			Latitud (S)	Longitud (W)				
Apurímac	AP	Abancay	13°38´33"	72°52´54"	2500	1	10	1
Arequipa	AR	Chiguata	16°24´31.24"	71°22´42.77"	2946	1	20	1
		Distrito Cerro colorado	16°22'39.8"	71°37'06.5"	2406	1	20	1
		Valle de Tambo	17°01'06.1"	72°00'47.6"	84	1	20	1
		Maca - Valle de Colca	15°38'33"	71°46'12"	3262	1	20	1
		San Jerónimo	13°33'07"	71°52'54.1"	3280	1	14	1
Cusco	CU	Pilcopata	12°54´41.55"	71°24´41.60"	689	1	11	1
		Tinta provincia de Canchis	14°08'09.6"	71°24'33.5"	3484	1	10	1
Huánuco	HU	Tingo Maria (Sector Muyuna)	9°16´13"	76°0´0.54"	649	4	20	4
Ica	IC	Distrito de Santiago	14°11'08"	75°42'53"	378	1	10	1
Junín	JU	Pichanaki	10°55'35.8"	74°52'27.1"	1030	1	12	1
		El Mantaro	11°49´20"	75°23´39"	3320	1	10	1
La Libertad	LL	Trujillo	8°6´57.6"	79°1´47.9"	34	1	20	1
Lambayeque	LA	Picsi-Capote	6°42´45.3"	79°48´57.4"	40	1	20	1
Lima	LI	Palpa	11°29´11.7"	77°07´16.5"	145	4	10	4
		San Miguel de Acos	11°16´56.6"	76°45´40.6"	1576	3	10	3
Loreto	LO	Túpac Amaru	5°58´1.29"	70°6´47.4"	148	1	12	1
Piura	PI	Chulucanas	5°05´45.9"	80°9´20.7"	89	1	20	1
		Chulucanas				1	26	1
		La Matanza	5° 13' 18.4"	80° 06' 06.9"	111	1	28	1
San Martin	SM	Nueva Jerusalén	6°02'00"	76°58'00"	860	1	10	1
		Chazuta	6°34´23"	76°08´19"	250	1	8	1
Total						30	451	30

4.3 Extracción y cuantificación del ADN total

El proceso de extracción del ADN fue optimizado empleando diferentes estructuras corporales (cabeza, patas y tórax) y el cuerpo total, y se estandarizaron factores como tiempo de lisis y volumen de elución.

Para la extracción del ADN total se empleó finalmente el músculo torácico de una abeja. Primero, se incubó la muestra a 50°C por 30 min para eliminar residuos de hielo y evaporar el alcohol. Luego se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*), para retirar los residuos adheridos al cuerpo (como polen, cera, etc.). El exoesqueleto que protege la musculatura fue retirado con pinzas para facilitar la digestión o lisis celular.

Se empleó el kit de extracción *High Pure PCR Template Preparation* de ROCHE (USA) con el cual el ADN se adhiere a una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas para promover la desnaturalización de proteínas y así obtener un ADN libre de componentes celulares. Se siguió las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones.

- El tiempo de incubación para la lisis y digestión con el buffer de lisis y la proteinasa *K* fue realizado por 16 horas (*overnight*).
- La elución del ADN extraído se hizo en un volumen de 60 µL.

La calidad del ADN extraído se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y con un marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific™, UE).

El ADN extraído de cada individuo fue cuantificado (ng/µL) por fluorimetría con el *Qubit dsDNA HS* de Invitrogen (USA). Este kit emplea fluorocromos que se intercalan con el ADN para emitir una fluorescencia que se puede leer a 260 nm.

4.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más empleadas en biología molecular que permite generar millones de copias (amplificar) de un fragmento (o gen) de ADN *in vitro*. El producto final de la PCR llamado amplicón se emplea en técnicas moleculares posteriores, por ejemplo, el secuenciamiento o clonación dentro de un plásmido para futuros experimentos y se puede visualizar por una electroforesis en gel. La PCR emplea una enzima ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) y una serie de ciclos térmicos (generalmente 35 ciclos) divididos en tres etapas:

- i. Desnaturalización (94 – 95°C): En esta primera etapa la temperatura elevada permite separar o desnaturalizar las dos hebras de ADN para obtener así una plantilla de cadena simple.
- ii. Hibridación (48 – 65°C): La temperatura en esta etapa depende de los cebadores a emplearse. Estas pequeñas secuencias de cadena simple (*cebadores forward “F” y reverse “R”*) se unen a los extremos de la plantilla en una temperatura específica.
- iii. Extensión (72°C): En esta última etapa la enzima se activa y comienza a extender la cadena complementaria a la plantilla a partir de la secuencia de los cebadores.

La amplificación por PCR se estandarizó variando la concentración de cloruro de magnesio (MgCl_2), la concentración de ADN (ng) y la temperatura de hibridación o *annealing* (T_a). Los cebadores utilizados se eligieron a partir de estudios previos como se detalla en la Tabla 4. La reacción de PCR (por un individuo) tuvo un volumen final de 20 μL con 2 μL Buffer PCR 10X, 0.8 μL MgCl_2 50 mM, 0.16 μL dNTPs 25 mM, 0.8 μL por cada cebador 10 μM , 0.025 U de Taq polimerasa *Platinum 5U (Invitrogen, USA)* y 4 μL de ADN total (20 ng aproximadamente).

Las amplificaciones se desarrollaron en el termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem, USA). El ciclado térmico para las reacciones fue de 94 °C (5 min), 35 ciclos de [94 °C (30 s para COI, 45 s para ND5 y 16S rRNA), 56 °C (30 s para COI y 45 s para 16S rRNA), 48 °C (45 s para ND5) y 72 °C (30 s para COI y 45 s para 16S rRNA y ND5)] y 72 °C (5 min).

Los primers empleados se detallan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores de los marcadores de mtDNA empleados en el estudio

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5→3)	Tamaño (pb)	Posición en el mtDNA completo (bp) de <i>A. mellifera</i>	Tamaño de amplicón (pb)	Fuente
COI	COI-F	5'GATTACTTCCTCCCTCATTA 3'	20	2095-3123	1028	Nielsen <i>et al.</i> 1999; Pérez 2009.
	COI-R	5'AATCTGGATAGTCTGAATAA 3'	20			
16S rRNA	16S rRNA-F	5'CAACATCGAGGTCGCAAACATC 3'	21	13479-14443	964	Crozier & Crozier 1993; Nielsen <i>et al.</i> 1999; Pérez 2009.
	16S rRNA-R	5'GTACCTTTTGTATCAGGGTTGA 3'	22			
ND5	ND5-F	5'TCGAAATGAATAGGATACAG 3'	20	505-1326	822	Bouga <i>et al.</i> 2005; Martimianakis <i>et al.</i> 2011
	ND5-R	5'GGTTGAGATGGTTTAGGATT 3'	20			

El tamaño de los amplicones se verificó por electroforesis en un gel de agarosa 1.7% conteniendo bromuro de etidio (0.1 µg/mL) en tampón Tris Borato EDTA (TBE 0.5 X). Se utilizó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™, UE), el cual tiene una escala de tamaños que van desde 100 a 3000 pb. El potencial eléctrico de la fuente de poder fue de 80 voltios y la corrida tardó 80 minutos. Finalmente, los amplicones se visualizaron con el documentador de gel (Gel Doc XR+) controlado con el programa Image Lab™, ambos de BIO-RAD.

4.3.2 Secuenciamiento del ADN

Los productos obtenidos de la amplificación del ADN por PCR se enviaron a la empresa MACROGEN (Maryland, USA) para su purificación y posterior secuenciamiento por el

método de Sanger. El secuenciamiento de los amplicones se realizó para las secuencias sentido y anti-sentido (*forward* y *reverse*, respectivamente) de los tres marcadores genéticos. Ya que se asume que todas las obreras de una colmena son clonas, realizamos una secuenciación preliminar donde seleccionamos al azar diez individuos de tres colmenas y secuenciamos los productos de amplificación de cada marcador mitocondrial. Los resultados de esta secuenciación indicaron que las secuencias eran idénticas, por lo que se continuó el trabajo seleccionando al azar un individuo a partir de las 30 colmenas muestreadas en los 12 lugares de colecta. Finalmente, se secuenciaron 30 productos de PCR para cada uno de los marcadores.

4.4 Análisis Bioinformático

4.4.1 Ensamblaje y verificación de secuencias de ADN

Las secuencias *forward* y *reverse* (de cada individuo) fueron ensambladas con el programa *SeqTrace* (Stucky 2012), así como también la generación de la secuencia consenso. El mínimo valor de calidad aceptado QV (*quality value*) para las secuencias ensambladas según el programa es de 15. También con el programa se recortó los extremos de baja fidelidad y se curaron las bases nitrogenadas ambiguas. Posteriormente, las secuencias consensos de cada muestra se exportaron en formato FASTA (*fas) para su alineamiento. Este procedimiento se siguió con cada una de las secuencias obtenidas para cada marcador (COI, ND5 y 16S rRNA).

Posteriormente, con la finalidad de confirmar que los especímenes correspondieran con *Apis mellifera* las secuencias de nucleótidos amplificadas para los tres marcadores fueron comparadas con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI -*National Center for Biotechnology Information*) empleando la herramienta BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschup *et al.* 1990).

4.4.2 Alineamiento múltiple de secuencias

Para el alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas, se empleó una secuencia de referencia tomada del Banco de Genes (*GenBank*) del NCBI. Dicha secuencia (Código de Acceso: L06178.1) corresponde al primer genoma mitocondrial completo de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993).

La construcción de la matriz de alineamiento se realizó empleando el algoritmo MUSCLE (*Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*) (Edgar 2004) implementado en el programa MEGA 7.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar *et al.* 2016) con los parámetros por defecto. Este algoritmo realiza un alineamiento progresivo y corregido por pares de secuencias nucleotídicas y considera cada una de las posiciones como un carácter homólogo para luego ordenarlos de tal forma que tengan la misma posición vertical. Es así que se puede identificar, localizar y verificar los polimorfismos entre las diferentes secuencias ingresadas al programa. También se determinó la composición de bases nitrogenadas de las secuencias y luego, se exportó la matriz generada del alineamiento múltiple en formato FASTA (*fas).

Para un análisis más robusto se generó una matriz de alineamiento concatenada con un total de 47 secuencias nucleotídicas de 2708 pb, incluyendo las secuencias de los tres genes y las del GenBank, con el programa Mesquite 3.51 (Maddison & Maddison 2018), la cual se exportó en formato NEXUS (*nexus).

4.4.3 Polimorfismo y diversidad genética de los genes

Primero, se obtuvo la información sobre las posiciones conservadas y los nucleótidos parsimoniosamente informativos con MEGA 7. La diversidad genética de los especímenes de *A. mellifera* se examinó con el programa DnaSP 5.0 (Librado & Rozas 2009), que permite calcular los sitios polimórficos (S), los índices de diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (Hd), así como también el número de haplotipos (H).

El grado de polimorfismo entre las secuencias puede ser determinado mediante el cálculo del número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de las secuencias analizadas para un determinado marcador (Π); sin embargo, debido a que este valor puede ser mayor para secuencias largas en comparación con secuencias cortas, una mejor medida para comparar la variación de secuencias en un loci es calcular el parámetro de diversidad nucleotídica (π), porque esta medida considera la longitud de la secuencia. Este índice se calcula como $\pi = \Pi / L$, donde L es la longitud de la secuencia estudiada (Nei 1979). Por otro lado, la diversidad haplotípica (H_d) mide la frecuencia de un haplotipo en un set de datos.

Adicionalmente, se empleó el test estadístico de neutralidad de Tajima (D), que es calculado en función del valor de θ , que es una medida del espectro de las frecuencias alélicas en una población. Este valor puede calcularse empleando el número de sitios polimórficos (S) o el valor de π (Mousset *et al.* 2004). De acuerdo con Tajima, en condiciones de neutralidad el número de sitios segregativos (polimorfismos) debe ser igual al número promedio de diferencias nucleotídicas, por lo tanto, se espera que el valor de D sea cercano de cero (Tajima 1989). Debido a que ambos valores son afectados de forma diferente por la selección natural, un incremento de variantes raras afectará en mayor medida al número de sitios segregativos dando como resultado un valor de D negativo. Mientras que una falta de variantes raras (ausencia de alelos raros) resultará en un valor positivo de D, pues resultará en un valor de π incrementado. Esta interpretación del valor de D solo puede hacerse cuando se determina el valor de significancia (Hancock & Rienzo 2008).

4.4.4 Análisis filogenético

Se emplearon dos metodologías para inferir las relaciones de parentesco entre las diferentes secuencias nucleotídicas: el método de distancia *Neighbour-Joining* (NJ) en base a las distancias genéticas de las secuencias y el método probabilístico por Inferencia

Bayesiana (BI, *Bayesian Inference*), el cual emplea las probabilidades posteriores de los árboles generados.

Con el método NJ se construye árboles filogenéticos a partir de una matriz de distancia o diferencias genéticas entre las secuencias nucleotídicas a comparar. Para ello, el algoritmo parte de un árbol no resuelto con topología en forma de estrella donde todas las secuencias problema se encuentran unidas por un solo nodo. Poco a poco, el algoritmo une las secuencias con menor diferencia (vecinos más cercanos) hasta completar la unión de todas. Este método, no asume la hipótesis de un reloj molecular y solo refleja similitud entre sus vecinos (Saitou & Nei 1987).

A diferencia de los árboles basados en distancias genéticas, los de probabilidad como el de Inferencia Bayesiana, consideran los cambios que ocurren en cada posición del alineamiento por lo cual recurren a modelos evolutivos y modelos de sustitución nucleotídica.

La Inferencia Bayesiana (BI) es un método de inferencia estadística que emplea el teorema de Bayes para estimar la probabilidad posterior (PP) de un árbol, es decir, la probabilidad de que dicho árbol sea correcto según los datos (secuencias nucleotídicas) y el modelo evolutivo. Este método utiliza el algoritmo MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) el cual por una simulación estocástica evita el cálculo directo de las probabilidades posteriores y nos da una aproximación de éstas. El algoritmo parte de un árbol al azar (combinando los parámetros aleatoriamente) y va modificando ligeramente cada una de sus variables hasta evaluar el nuevo árbol, lo que conocemos como una generación. Después de cada generación el cambio propuesto se acepta o se rechaza de acuerdo al valor de la razón entre las probabilidades posteriores del árbol generado y el original. Si el valor de esta razón es mayor a uno, entonces el nuevo árbol se acepta y las MCMC comienzan una nueva búsqueda a partir de este. En esta búsqueda las MCMC pueden caer en el error de

encontrar muchos árboles con valores altos de probabilidad posterior, para evitarlo se emplean varias cadenas MCMC en simultáneo y adicionalmente es mejor realizar cada análisis por duplicado (Nascimento *et al.* 2017).

El software empleado en este trabajo considera cuatro cadenas de búsqueda (tres calientes y una fría). Una cadena caliente es aquella que por un factor matemático eleva la probabilidad posterior de los árboles para así explorar dentro de un espacio uniforme con probabilidades similares, esto facilita y optimiza la búsqueda de la cadena fría que al mantener la probabilidad posterior de los árboles generados acepta aquellos que no tienen una caída drástica de su probabilidad evitando caer entre máximos locales. Las cuatro cadenas intercambian aleatoriamente su condición de caliente o fría en cada búsqueda; sin embargo, es la cadena fría quien determina qué árbol es el que realmente tiene una mayor probabilidad posterior dentro de todos los árboles explorados (Nascimento *et al.* 2017).

En general, la construcción de un árbol filogenético parte de la comparación de dos secuencias genéticas homólogas (parten de un ancestro común) bajo un modelo evolutivo. Dicha comparación, conocida como distancia genética, mide las diferencias que hay entre ambas secuencias como producto de los eventos evolutivos (número de sustituciones) inmersos en ellas. Numéricamente es el cociente entre el número de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias dividido por la longitud total de las secuencias comparadas.

Para estimar las distancias genéticas se asumen modelos de sustitución nucleotídica, uno de ellos es el de Kimura - 2 parámetros. Este parte del modelo más simple propuesto de Jukes y Cantor (1969) que asume probabilidades iguales para las cuatro bases nucleotídicas. Mientras que el modelo Kimura 2-parámetros considera que las transiciones tienen mayor probabilidad de ocurrir que las transversiones, es decir, ambos eventos tienen diferentes probabilidades.

En este estudio, el análisis de los árboles por Neighbor Joining (NJ) se implementó en MEGA 7.0 (Kumar *et al.* 2016) con un *bootstrap* de 1000 repeticiones y con los parámetros por defecto. Mientras que para el análisis por BI primero se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica según el criterio de información de Akaike (AIC), con JModelTest 2.1.10 (Posada 2003) y con Partition Finder (Lanfear *et al.* 2018) para la matriz concatenada. Los árboles filogenéticos generados por BI se elaboraron en la plataforma de Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001) con el algoritmo MCMC y con la variante de búsqueda de árboles *Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo* (MCMCMC) para lo cual, se utilizaron cuatro cadenas de Markov (una fría y tres calientes) de 10 millones de generaciones cada una con una frecuencia de muestreo de 5000 generaciones en dos corridas independientes, cuya convergencia fue evaluada con el índice de desviación estándar (<0.001). El *burning* o “quemado” de los árboles hipotéticos con la menor probabilidad posterior fue del 25% (árboles iniciales).

El bootstrap es un método estadístico que le da un intervalo de confianza a los árboles filogenéticos. Este método implica re-muestreo con reemplazo de cada punto (nucleótidos de las secuencias moleculares) de la matriz (*taxa* x nucleótido de la secuencia) de datos asumiendo que cada nucleótido ha evolucionado independientemente de los demás (Felsenstein 1985).

En la construcción de todos los árboles filogenéticos, se empleó como grupo externo “*outgroup*” a la especie filogenéticamente más cercana a *Apis mellifera*, *Apis cerana* (Fabricius 1793) (AP018431.1); además, se incluyeron 19 secuencias de diferentes subespecies de *A. mellifera* tomados del GenBank. Finalmente, los árboles se visualizaron y editaron con FigTree 1.4.0 (Rambaut 2006).

Tabla 5. Códigos de Acceso de los genes mitocondriales de las subespecies de *A. mellifera* empleadas en el presente trabajo, descargadas del GenBank y usadas como referencia en el presente trabajo.

Código de acceso	Subespecie	Gen	Linaje de abeja	Región geográfica	Referencia
KX943034.1	<i>A. m. scutellata</i> x <i>A. m. capensis</i>	Genoma mitocondrial completo	A	Sudáfrica	Eimanifar et al. (2017)
MF678581.1	<i>A. m. monticola</i>	Genoma mitocondrial completo	A	África oriental	Eimanifar et al. (2017)
MG552694.1	<i>A. m. capensis</i>	Genoma mitocondrial completo	A	Sudáfrica	Eimanifar et al. (2018)
MG552696.1	<i>A. m. capensis</i>	Genoma mitocondrial completo	A	Sudáfrica	Eimanifar et al. (2018)
MG552702.1	<i>A. m. scutellata</i>	Genoma mitocondrial completo	A	Sudáfrica	Eimanifar et al. (2018)
MN585109.1	<i>A. m. adansonii</i>	Genoma mitocondrial completo	A	África occidental	Boardman et al. (2019)
AP018403.1	<i>A. m. carpatica</i>	Genoma mitocondrial completo	C		Ilyasov et al. (2019)
JQ778283.1	<i>A. m. carnica</i>	16S rRNA	C		Georgijev et al. (2012)
JQ778289.1	<i>A. m. carnica</i>	16S rRNA	C		Georgijev et al. (2012)
KX908209.1	<i>A. m. ligustica</i>	Genoma mitocondrial completo	C		Kim et al. (2018)
L06178.1	<i>A. m. ligustica</i>	Genoma mitocondrial completo	C		Crozier & Crozier (1998)
MH341407.1	<i>A. m. ligustica</i>	Genoma mitocondrial completo	C		Kim et al. (2019)

MN250878.1	<i>A. m. carnica</i>	Genoma mitocondrial completo	C	Boardman et al. (2019)
KM458618.1	<i>A. m. intermissa</i>	Genoma mitocondrial completo	M	Hu et al. (2014)
MF351881.1	<i>A. m. sahariensis</i>	Genoma mitocondrial completo	M	Haddad et al. (2017)
AP018404.1	<i>A. m. caucasica</i>	Genoma mitocondrial completo	O	Ilyasov et al. (2019)
KY464957.1	<i>A. m. meda</i>	Genoma mitocondrial completo	O	Wang et al. (2017)
MT188686.1	<i>A. m. anatoliaca</i>	Genoma mitocondrial completo	O	Turquía

4.4.5 Red de haplotipos – Network

Las relaciones filogenéticas de los genes estudiados (COI, 16S rRNA y ND5) se representaron en una red de haplotipos con el programa NETWORK 4.2.0.1 bajo el algoritmo Median – Joining (MJ) (Bandelt *et al.* 1999). Para ello, se incluyeron las secuencias genéticas del GenBank detalladas en la Tabla 5.

Como señalan Huson y Scornavacca (2010), una red de haplotipos es una red filogenética no enraizada y construida a partir de las distancias genéticas entre las secuencias nucleotídicas, sus nodos representan los diferentes haplotipos que surgen tras el colapso de las secuencias estrechamente relacionadas.

Por otro lado, el algoritmo Median Joining o de unión media construye una subred informativa adicional en la que minimiza el número de nodos uniéndolos después a la red de haplotipos previamente construida. Este algoritmo es recomendado para el trabajo con secuencias muy cercanas que hayan evolucionado sin recombinación (Bandelt *et al.* 1999).

5. RESULTADOS

5.1 Extracción y cuantificación del ADN total

Se obtuvieron concentraciones de ADN total entre 0.4 a 15 ng/ μ L con el tejido torácico. Este segmento del cuerpo del insecto presentó una menor degradación en comparación con el ADN obtenido del cuerpo completo de la abeja y las otras estructuras como patas y cabeza.

5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

Las muestras de ADN mitocondrial evaluadas en este trabajo fueron amplificadas según los protocolos optimizados de la PCR para cada gen. En total se obtuvieron 30 productos específicos de PCR con tamaños / pesos moleculares aproximados de 822, 964 y 1028 pares de bases para ND5, 16S rRNA y COI, respectivamente (Figuras 7, 8 y 9). No se visualizaron bandas inespecíficas en los geles de agarosa.

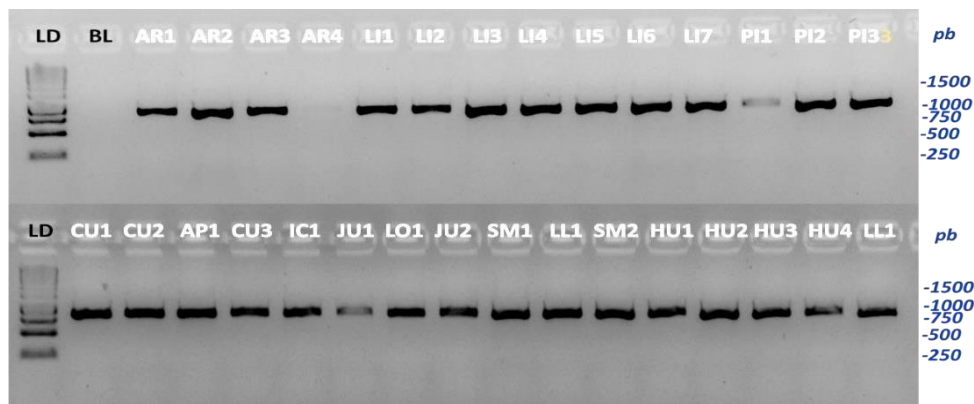


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen mitocondrial ND5, tinción con bromuro de etidio. Los códigos de las muestras se indican en la parte superior de cada columna. LD: marcador de tamaño molecular (1 kb). Tamaño del producto: 822 pb. BL: control negativo.

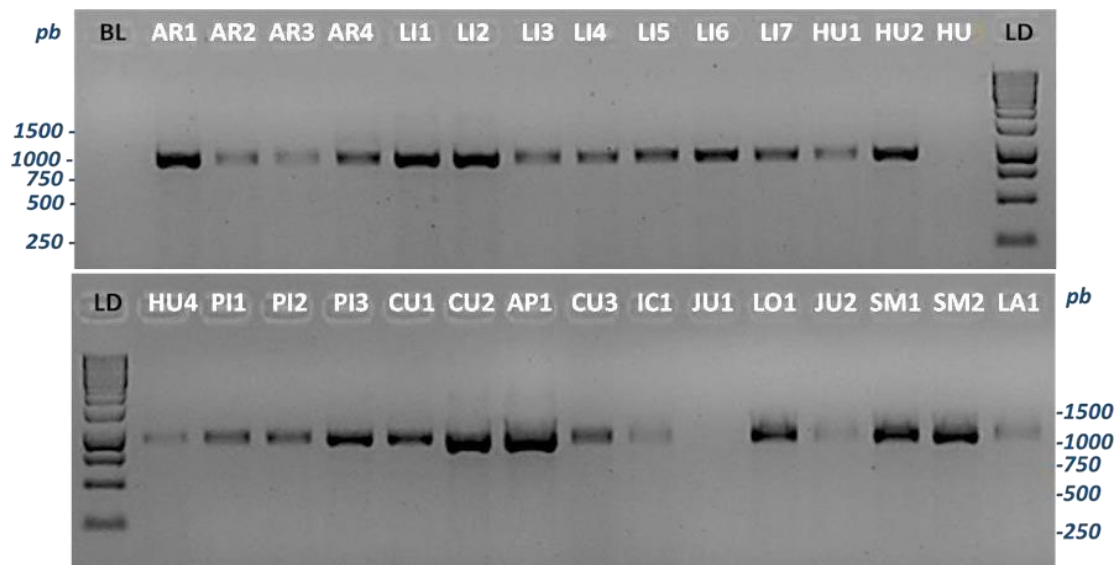


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen mitocondrial 16S rRNA, tinción con bromuro de etidio. Los códigos de las muestras se encuentran en la parte superior. LD: marcador de tamaño molecular (1 kb). Tamaño del producto: 964 pb. BL: control negativo

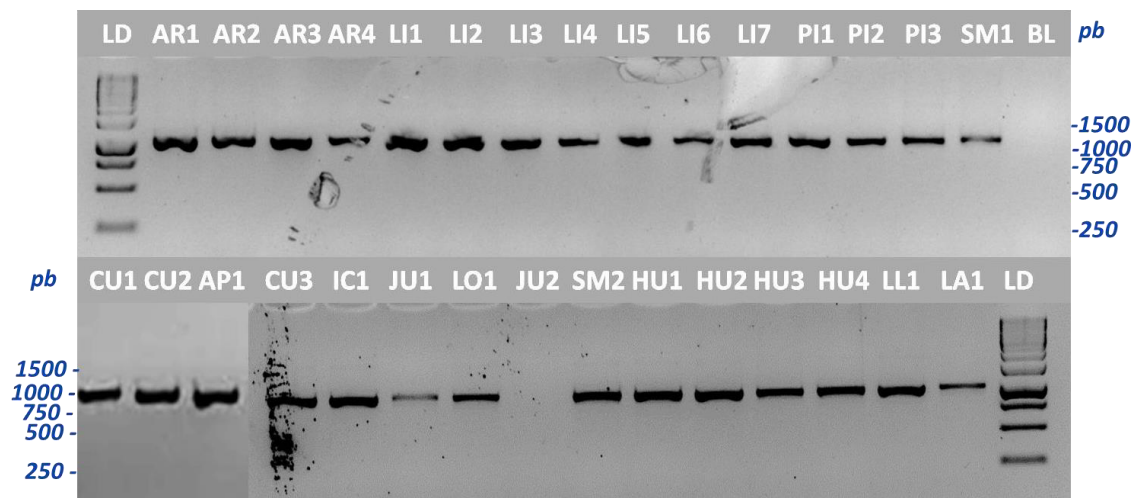


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen mitocondrial COI, tinción con bromuro de etidio. Los códigos de las muestras se encuentran en la parte superior. LD: marcador de tamaño molecular (1 kb). Tamaño del producto: 1028 pb. BL: control negativo.

5.3 Secuenciamiento de ADN

De los 90 productos amplificados de la PCR, solo 87 tuvieron electroferogramas o cromatogramas con picos bien definidos y con valores de calidad mayores a 15 (valor mínimo de QV aceptado por el programa *SeqTrace*) (Figura 10). Los 3 restantes (2 secuencias para el gen ND5 y 1 secuencia para el gen 16S rRNA) fueron descartados de los análisis posteriores por su baja calidad de cromatogramas (Anexo 10.2).

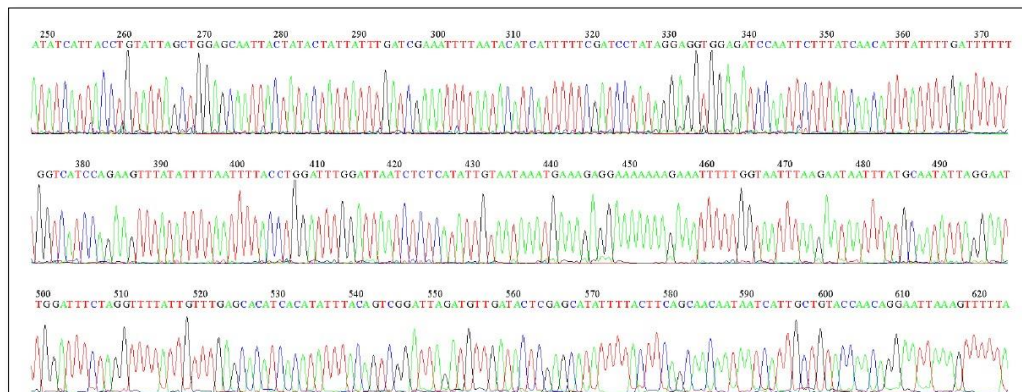


Figura 10. Representación de la calidad de los electroferogramas obtenidos en el estudio. El electroferograma corresponde a la secuencia sentido para el gen COI de la muestra AR4 (Valle de Colca - Arequipa). Electroferogramas similares fueron obtenidos también para los genes ND5 y 16S rRNA

5.4 Análisis Bioinformático

5.4.1 Ensamblaje y verificación de secuencias de ADN

El ensamblaje de las secuencias *forward* y *reverse*, para cada muestra, generó 28, 29 y 30 secuencias nucleotídicas para los análisis con los genes ND5, 16S rRNA y COI, respectivamente. Éstas obtuvieron porcentajes de identidad del 100% respecto a las secuencias de *A. mellifera* presentes en la base de datos del NCBI.

5.4.2 Alineamiento múltiple de secuencias

Luego del ensamblaje y la curación de nucleótidos, el tamaño de las secuencias alineadas fue de 793, 911 y 971 pb para ND5, 16S rRNA y COI, respectivamente. En general, la

composición nucleotídica de las secuencias tuvo una alta concentración de bases nitrogenadas timina (T) y adenina (A) (Tabla 6).

Tabla 6. Composición promedio en porcentaje (%) de las bases nitrogenadas por cada gen empelado en el estudio.

Gen	Tamaño (pb)	Composición (%)			
		A	T	G	C
COI	971	33.9	41.6	12.6	11.9
16S rRNA	911	43.9	41.1	5	10
ND5	793	45.9	35.7	7.8	10.6

5.4.3 Polimorfismo y diversidad genética de los genes

Los polimorfismos presentes en las secuencias nucleotídicas con los genes ND5, 16S rRNA y COI se pueden visualizar detalladamente en las tablas 7, 8 y 9, respectivamente, además de sus respectivos haplotipos.

El marcador ND5 es el más conservado con cinco sitios polimórficos, de los cuales uno corresponde a un *singleton* en la posición 422 de la muestra AR1 (Arequipa). El 100% de los sitios parsimoniosamente informativos (posiciones 177, 246, 546 y 618) fueron transiciones pirimidínicas, mientras que el *singleton*, una transversion A→C (Tabla 7 y 10). En las secuencias alineadas para el gen 16S rRNA se observó dos *gaps* o espacios que corresponden a *indels* (inserciones-delecciones), estas se observaron en las posiciones 591 (T) y 592 (A) de ocho secuencias (Figura 11). Este marcador presentó nueve sitios parsimoniosamente informativos, todas transiciones y en su mayoría T/C→C/T (Tabla 10). Por otra parte, el gen COI fue el más polimórfico con 14 sitios polimórficos y parsimoniosamente informativos, el 85.7 % de estos fueron transiciones en su mayoría pirimidínicas (71.4 %) (Tabla 10).

Tabla 7. Alineamiento múltiple de 28 secuencias nucleotídicas para el gen ND5 con los sitios polimórficos.

N°	Individuo	Haplotipo	1	2	4	5	6
			7	4	2	4	1
			7	6	2	6	8
1	AmAP1	HI	C	T	A	C	T
2	AmAR2	HI
3	AmCU1	HI
4	AmCU2	HI
5	AmCU3	HI
6	AmHU1	HI
7	AmHU2	HI
8	AmHU3	HI
9	AmHU4	HI
10	AmIC1	HI
11	AmJU1	HI
12	AmJU2	HI
13	AmLI1	HI
14	AmLI2	HI
15	AmLI3	HI
16	AmLI4	HI
17	AmLI5	HI
18	AmLI6	HI
19	AmLI7	HI
20	AmLL1	HI
21	AmLO1	HI
22	AmPI1	HI
23	AmPI2	HI
24	AmPI3	HI
25	AmSM1	HI
26	AmSM2	HI
27	AmAR1	HII	T	C	C	T	C
28	AmAR3	HIII	T	C	.	T	C

Posición 422 muestra el singleton (citosina resaltada en rojo) que corresponde a la muestra AR1 (Chiguata – Arequipa).

Tabla 8. Alineamiento múltiple de 29 secuencias nucleotídicas para el gen 16S rRNA con los sitios polimórficos.

N°	Individuo	Haplotipo									
			1			2			4		
			6	0	6	5	1	8	8	0	
			9	9	5	6	7	4	0	8	3
1	AmAP1	HI	G	A	C	T	A	C	C	T	C
2	AmAR1	HI
3	AmAR3	HI
4	AmCU1	HI
5	AmCU3	HI
6	AmIC1	HI
7	AmLO1	HI
8	AmAR2	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
9	AmCU2	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
10	AmHU1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
11	AmHU2	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
12	AmHU3	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
13	AmHU4	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
14	AmJU1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
15	AmLA1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
16	AmLI1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
17	AmLI2	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
18	AmLI3	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
19	AmLI4	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
20	AmLI5	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
21	AmLI6	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
22	AmLI7	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
23	AmLL1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
24	AmPI1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
25	AmPI2	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
26	AmPI3	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
27	AmSM1	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
28	AmSM2	HII	A	G	T	C	G	T	T	C	T
29	AmJU2	HI	A

Las posiciones 9, 69 y 457 indican transiciones purícas G/A→A/G, mientras que las posiciones 105, 266, 514, 680, 688 y 903 corresponden a transiciones pirimidícas T/C→C/T.

Tabla 9. Alineamiento múltiple de 30 secuencias nucleotídicas para el gen mitocondrial COI indicando los 14 sitios polimórficos.

N°	Individuo	Haplotipo														
			1	2	3	3	3	4	4	5	5	5	7	7	8	9
			9	5	4	5	5	7	7	2	3	9	7	9	1	2
				7	0	0	2	3	6	3	5	5	8	3	4	9
1	AmAP1	HI	T	T	A	C	T	T	A	T	C	C	C	T	T	C
2	AmAR1	HI
3	AmAR3	HI
4	AmAR4	HI
5	AmCU1	HI
6	AmJU2	HI
7	AmAR2	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
8	AmCU3	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
9	AmHU2	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
10	AmHU3	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
11	AmHU4	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
12	AmIC1	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
13	AmLI1	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
14	AmLI2	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
15	AmLI3	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
16	AmLI4	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
17	AmLI5	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
18	AmLI6	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
19	AmLL1	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
20	AmPI1	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
21	AmPI3	HII	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	.	A	T
22	AmCU2	HIII	C	C	.	T	A	C	G	C	T	T	T	.	A	T
23	AmHU1	HIII	C	C	.	T	A	C	G	C	T	T	T	.	A	T
24	AmLO1	HIII	C	C	.	T	A	C	G	C	T	T	T	.	A	T
25	AmSM1	HIII	C	C	.	T	A	C	G	C	T	T	T	.	A	T
26	AmJU1	HIV	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	C	A	T
27	AmLA1	HIV	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	C	A	T
28	AmLI7	HIV	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	C	A	T
29	AmPI2	HIV	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	C	A	T
30	AmSM2	HIV	C	C	G	T	A	C	G	.	T	T	.	C	A	T

Las posiciones 352 y 814 corresponden a las transversiones A→T.

Tabla 10. Porcentaje de frecuencias (%) de transiciones (Tr) y transversiones (Tv) de los genes ND5, 16S rRNA y COI.

Gen	N	L (pb)	S	pi	s	Transiciones (%)		Transversiones (%)				Tr/Tv
						A/G	T/C	A/C	A/T	G/C	G/T	
ND5	28	793	5	4	1	-	100	-	-	-	-	-
16S rRNA	29	911	9	9	-	33.3	66.7	-	-	-	-	-
COI	30	971	14	14	-	14.3	71.4	-	14.3	-	-	6

N: número de secuencias nucleotídicas, L (pb): longitud de secuencia nucleotídica, S: sitios polimórficos totales, pi: lugares informativos parsimoniosos, s: singleton. *Tr/Tv*: ratio de transiciones y transversiones.

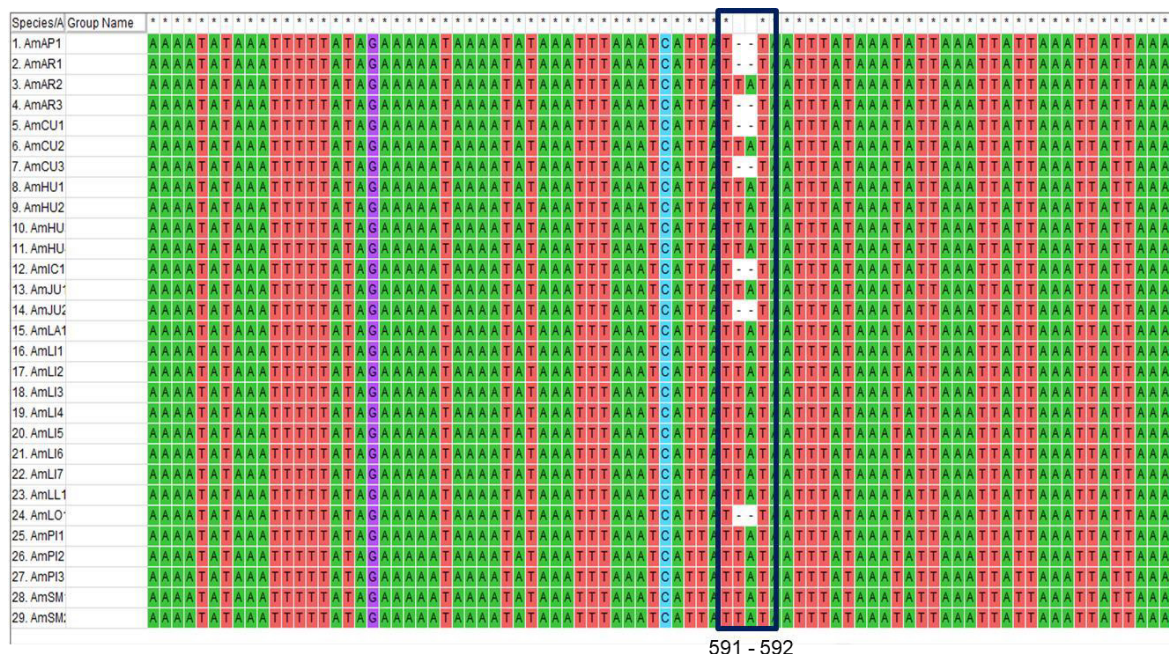


Figura 11. Alineamiento múltiple del gen 16S rRNA de las muestras secuenciadas donde se indica los indels encontrados en las posiciones 591 y 592.

Se encontraron tres haplotipos para los 28 especímenes estudiados empleando el marcador mitocondrial ND5, donde el haplotipo I fue detectado en 11 de las 12 regiones (frecuencia = 0.94). Los haplotipos II y III fueron encontrados solo en Arequipa (Tabla 11). Con el marcador 16S rRNA también se encontraron tres haplotipos. El haplotipo II presentó una mayor frecuencia en comparación con los haplotipos I y III, encontrándose en nueve regiones (0.60, 0.36 y 0.04, respectivamente) (Tabla 11).

Finalmente, fueron cuatro los haplotipos encontrados para el gen COI, siendo el haplotipo II el más común entre las regiones estudiadas (siete de las 12 regiones), con una frecuencia de 0.41; mientras que el haplotipo III fue el menos común con una frecuencia de 0.17 (cuatro de las 12 regiones) (Tabla 11).

Los haplotipos encontrados en este estudio tienen un 100% de identidad con secuencias genéticas del GenBank adicionales a las de la Tabla 5 (Tabla 12 y Anexo 10.3).

La diversidad haplotípica y nucleotídica general fue baja para los tres marcadores. Estos valores fueron calculados para cada una de las regiones incluidas en el estudio y de forma general, considerando los 12 lugares de muestreo como una sola población.

A partir del marcador ND5 se determinó que sólo los individuos procedentes de Arequipa ($n=3$) mostraron diversidad haplotípica $Hd = 1.0 \pm 0.272$; sin embargo, el valor de diversidad nucleotídica fue bajo ($\pi = 0.004 \pm 0.002$). Las demás regiones presentaron un valor $\pi = 0$, indicando que la secuencia de ND5 fue igual para todos los especímenes incluidos en el estudio. En general este marcador mostró los valores de diversidad genética más bajas. El valor del test de Tajima para este marcador fue negativo ($D = -1.434$), pero no significativo ($p > 0.10$) (Tabla 13).

Con el gen 16S rRNA ($n=29$) se obtuvo un mayor valor general de Hd (0.431 ± 0.087) y al realizar el análisis de Tajima se obtuvo un valor positivo de 1.910; sin embargo, este resultó ser no significativo con un $0.05 < p < 0.10$ (Tabla 14).

En comparación a los dos marcadores moleculares anteriores, con el marcador COI se obtuvieron tres regiones (Cusco ($n=3$), Junín ($n=2$) y San Martín ($n=2$)) con una diversidad haplotípica total de $Hd = 1.0$. Asimismo, al evaluar todas las secuencias ($n=30$) como una sola población, se obtuvo una $Hd = 0.687 \pm 0.064$. El análisis de Tajima para este marcador fue positivo ($D = 0.946$) pero no alcanzó nivel de significancia (valor $p > 0.10$) (Tabla 15).

Adicionalmente, se trabajó con los datos de la matriz concatenada ($n=30$) y se obtuvo un valor total de $Hd = 0.687 \pm 0.064$, similar al valor encontrado con el marcador COI. El mismo escenario se repitió con el valor de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.005 \pm 0.004$) y el análisis de Tajima, siendo positivo ($D = 0.946$) y sin nivel de significancia (valor $p > 0.10$).

Tabla 11. Distribución y frecuencia de haplotipos para los genes mitocondriales ND5, 16S rRNA y COI detallado por departamento de colecta.

Departamento	ND5				16S rRNA				COI				
	N	I	II	III	N	I	II	III	N	I	II	III	IV
Apurímac	1	1.00	-	-	1	1.00	-	-	1	1.00	-	-	-
Arequipa	3	0.30	0.30	0.30	3	0.67	0.33	-	4	0.75	0.25	-	-
Cusco	3	1.00	-	-	3	0.67	0.33	-	3	0.33	0.33	0.33	-
Huánuco	4	1.00	-	-	4	-	1.00	-	4	-	0.75	0.25	-
Ica	1	1.00	-	-	1	1.00	-	-	1	-	1.00	-	-
Junín	2	1.00	-	-	2	-	0.50	0.50	2	0.50	-	-	0.50
Lambayeque	0	-	-	-	1	-	1.00	-	1	-	-	-	1.00
Lima	7	1.00	-	-	7	-	1.00	-	7	-	0.86	-	0.14
La libertad	1	1.00	-	-	1	-	1.00	-	1	-	1.00	-	-
Loreto	1	1.00	-	-	1	1.00		-	1	-	-	1.00	-
Piura	3	1.00	-	-	3	-	1.00	-	3	-	0.70	-	0.30
San Martín	2	1.00	-	-	2	-	1.00	-	2	-	-	0.50	0.50
Total	28	0.94	0.03	0.03	29	0.36	0.60	0.04	30	0.22	0.41	0.17	0.20

N: número de secuencias por localidades, **I, II, III, IV:** haplotipos

Tabla 12. Concordancia de los haplotipos peruanos encontrados para *A. mellifera* según la base de datos del GenBank

Gen	Haplotipo	Base de datos GenBank		
		Código accesión	Subespecie	Linaje
ND5	HI	MG552702.1	<i>A. m. scutellata</i>	A
	HII	MH341408.1	<i>A. m. ligustica</i>	C
	HIII	MH341408.1	<i>A. m. ligustica</i>	C
16S rRNA	HI	AP018404.1	<i>A. m. caucasica</i>	O
	HII	MG552702.1	<i>A. m. scutellata</i>	A
	HIII	JQ778283.1	<i>A. m. carnica</i>	C
COI	HI	MH341407.1	<i>A. m. ligustica</i>	C
	HII	MG552702.1	<i>A. m. scutellata</i>	A
	HIII	MG552699.1	<i>A. m. scutellata</i>	A
	HIV	MG552700.1	<i>A. m. scutellata</i>	A

Tabla 13. Detalle de los índices de diversidad genética para el gen mitocondrial ND5.

Departamento	N	S	H	<i>Hd</i> ± SD	π ± SD	D
Arequipa	3	5	3	1.0 ± 0.272	0.004 ± 0.002	
Todos	28	5	3	0.140 ± 0.087	0.001 ± 0.005	-1.434*

N: número de secuencias por localidad, **S:** número de sitios polimórficos totales, **H:** número de haplotipos, ***Hd*:** diversidad haplotípica, **π :** diversidad nucleotídica, **SD:** desviación estándar y **D:** prueba de Tajima. Significancia estadística: * $p > 0.10$ (no significativa).

Tabla 14. Índices de diversidad genética para el marcador mitocondrial 16S rRNA. Se excluyeron las poblaciones con menos de dos haplotipos.

Departamento	N	S	H	<i>Hd</i> ± SD	π ± SD	D
Arequipa	3	9	2	0.667 ± 0.314	0.007 ± 0.003	
Cusco	3	9	2	0.667 ± 0.314	0.007 ± 0.003	
Junín	2	8	2	1.0 ± 0.500	0.009 ± 0.004	
Total	29	9	3	0.431 ± 0.087	0.004 ± 0.0008	1.910*

N: número de secuencias por localidad, **S:** número de sitios polimórficos totales, **H:** número de haplotipos, ***Hd*:** diversidad haplotípica, **π :** diversidad nucleotídica, **SD:** desviación estándar y **D:** prueba de Tajima. Significancia estadística: * $0.05 < p < 0.10$ (no significativa).

Tabla 15. Detalle de índices moleculares para el marcador mitocondrial COI

Departamento	N	S	H	<i>Hd</i> ± SD	π ± SD	D
Arequipa	4	11	2	0.500 ± 0.265	0.006 ± 0.003	-0.837*
Cusco	3	13	3	1.00 ± 0.272	0.009 ± 0.003	
Huánuco	4	3	2	0.500 ± 0.265	0.002 ± 0.009	-0.754*
Junín	2	12	2	1.00 ± 0.500	0.012 ± 0.006	
Lima	7	1	2	0.286 ± 0.196	0.0003 ± 0.0002	-1.006*
Piura	3	1	2	0.667 ± 0.314	0.001 ± 0.0003	
San Martín	2	4	2	1.00 ± 0.500	0.004 ± 0.002	
Todos	30	14	4	0.687 ± 0.064	0.005 ± 0.001	0.946*

N: número de secuencias por localidad, **S:** número de sitios polimórficos totales, **H:** número de haplotipos, ***Hd*:** diversidad haplotípica, **π :** diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar y **D:** prueba de Tajima. *Significancia estadística:* * $p > 0.10$ (no significativo).

5.4.4 Análisis filogenético

La construcción de las relaciones filogenéticas entre las secuencias genéticas de *A. mellifera* generaron árboles con grupos monofiléticos y con muchas politomías dentro de sus ramas, tanto por el método de Neighbor Joining como por el de Inferencia Bayesiana.

5.4.4.1 Marcador ND5

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias de *A. mellifera*, según el método NJ, muestran dos grupos. El primer grupo (bootstrap de 86%) está conformado en su mayoría por secuencias peruanas (26 de 28 secuencias) y subespecies de los linajes A y M. Específicamente, las secuencias peruanas se agrupan con las del linaje A con un soporte de 73% (Figura 12).

El segundo grupo (bootstrap de 65%) contiene subespecies de los linajes C y O, además de dos secuencias peruanas. Éstas corresponden a las muestras arequipeñas AR1 (localidad Chiguata) y AR3 (localidad Valle de Tambo), agrupadas a los linajes C (bootstrap de 66%) y O (bootstrap de 65%), respectivamente (Figura 12).

El análisis por inferencia bayesiana de acuerdo con los parámetros de JModelTest 2. 1. 10 (mejor modelo de sustitución nucleotídica GTR - *Generalised time-reversible*) confirman la

hipótesis anterior, mostrando una topología de árbol muy similar. Sin embargo, a diferencia de éste, el árbol por BI separa los linajes C y O en dos grupos diferentes, cada uno con probabilidades posteriores mayores a 0.99 (Figura 13).

5.4.4.2 Marcador 16S rRNA

El árbol NJ para el marcador 16S rRNA muestra tres agrupaciones de secuencias peruanas. La primera agrupa la mayoría de éstas con los linajes africano A y mediterráneo M con un soporte de 91%. Por otro lado, en la segunda se observan dos grupos: uno conformado por una muestra de El Mantaro (Junín – JU2) que comparte su origen con algunas abejas del linaje europeo C (bootstrap de 63%) y otro grupo peruano que se relaciona con abejas de los linajes C y O (bootstrap de 60%) (Figura 14).

Con el método de BI, según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY + I (Modelo de Hasegawa, Kishino y Yano), se refuerza las relaciones de parentesco que se obtuvieron con el método de distancia NJ. Es decir, se evidencia la clara separación de los linajes A y M de los linajes C y O con PP de 0.67 y 0.99, respectivamente (Figura 15).

5.4.4.3 Marcador COI

Las relaciones de parentesco analizadas por el método de distancia para el marcador COI, muestran cuatro agrupaciones. La primera está conformada por secuencias de algunas localidades peruanas de Piura, San Martín, Lima, Lambayeque y la selva de Junín (Chanchamayo), con un soporte de 64%. La segunda, comprende un mayor número de secuencias peruanas y una africana, *A. m. adansonii*, con un bootstrap del 65% (Figura 16). Las muestras peruanas de Apurímac, Arequipa, Cusco y la sierra de Junín (El Mantaro) conforman el tercer grupo junto a las subespecies de los linajes europeo C y oriental O (soporte del 87%). El cuarto grupo diverge de los otros tres y forma un grupo monofilético con un soporte del 90%, éste está compuesto solo por secuencias peruanas (Figura 16).

Los resultados del análisis por el método de BI según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica, GTR + I (*Generalised time-reversible*), son similares a los obtenidos por el método de distancia. Los grupos tienen un alto soporte en sus ramas (PP mayor a 0.95) (Figura 17).

5.4.4.4 Relación filogenética entre los genes

El árbol filogenético obtenido para la matriz concatenada, y según el método NJ tienen una topología similar a la que se obtuvo con el marcador COI, la distribución y la conformación de los grupos, y el soporte de bootstrap en sus ramas (Figura 18). Sin embargo, con el método por BI la conformación de los grupos cambió para las secuencias peruanas de Ica, Cusco (distrito de Tinta) y Loreto que se agruparon con los linajes europeo C y oriental O (PP de 0.97) (Figura 19). El mejor modelo de sustitución nucleotídica para el análisis por BI fue TIM2 + G, *Transition model*).

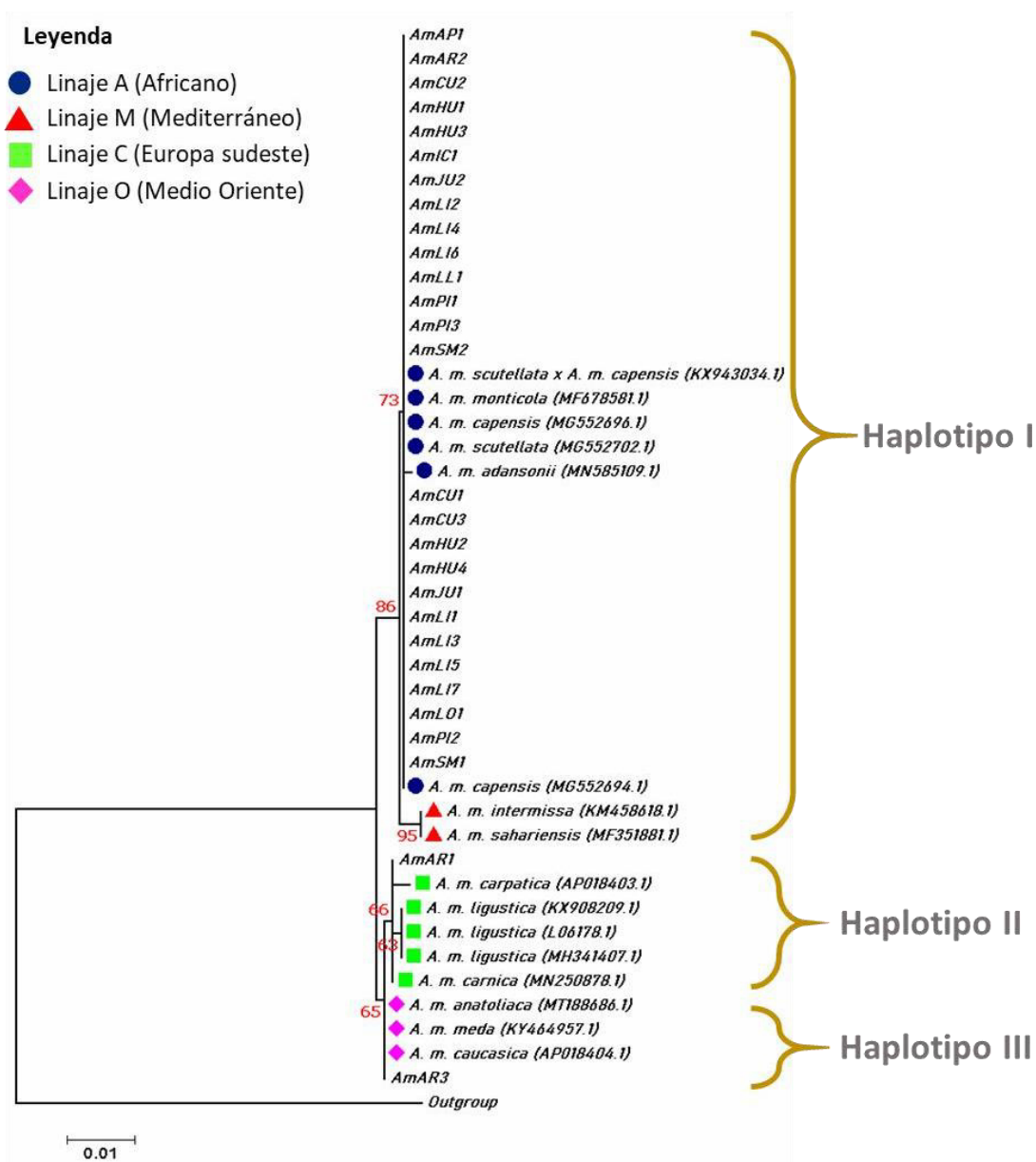


Figura 12. Relaciones filogenéticas para el marcador ND5 inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 28 secuencias nucleotídicas peruanas y 16 referencias del GenBank (tamaño de 796 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

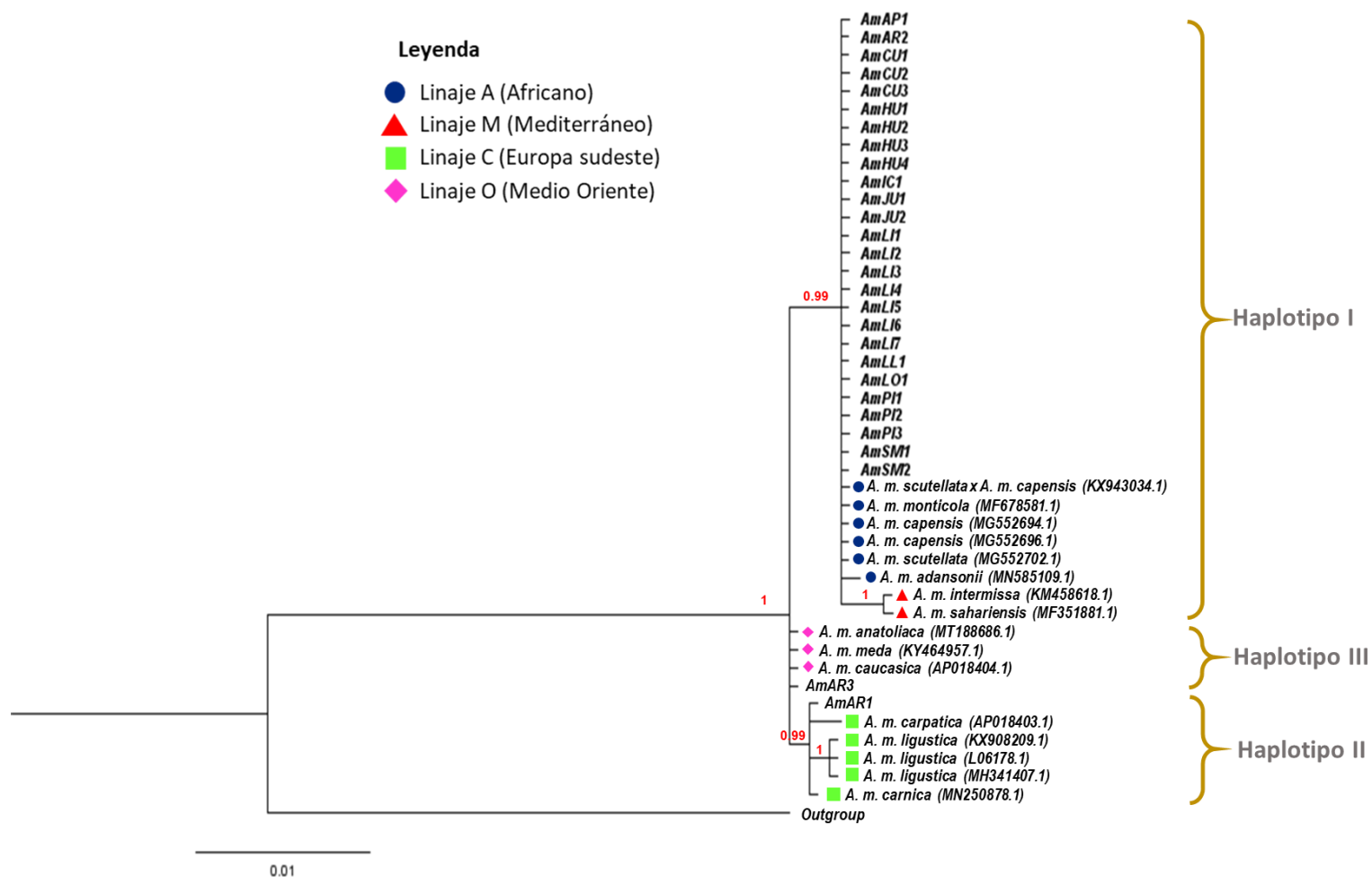


Figura 13. Relaciones filogenéticas para el marcador ND5 inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica GTR obtenidos de JModelTest bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC). Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

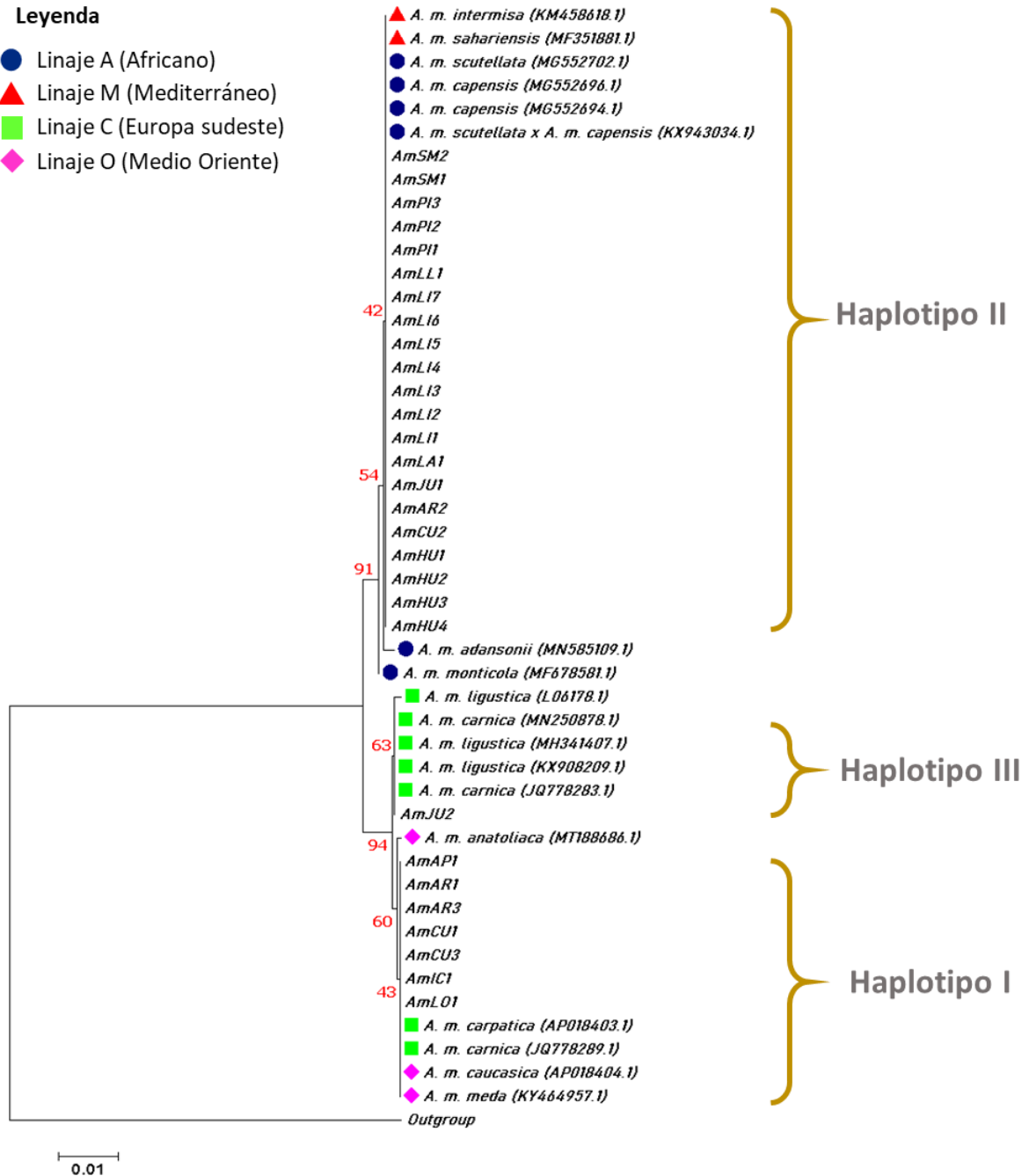


Figura 14. Relaciones filogenéticas para el marcador 16S rRNA inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 29 secuencias nucleotídicas peruanas y 18 referencias del GenBank (tamaño de 929 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

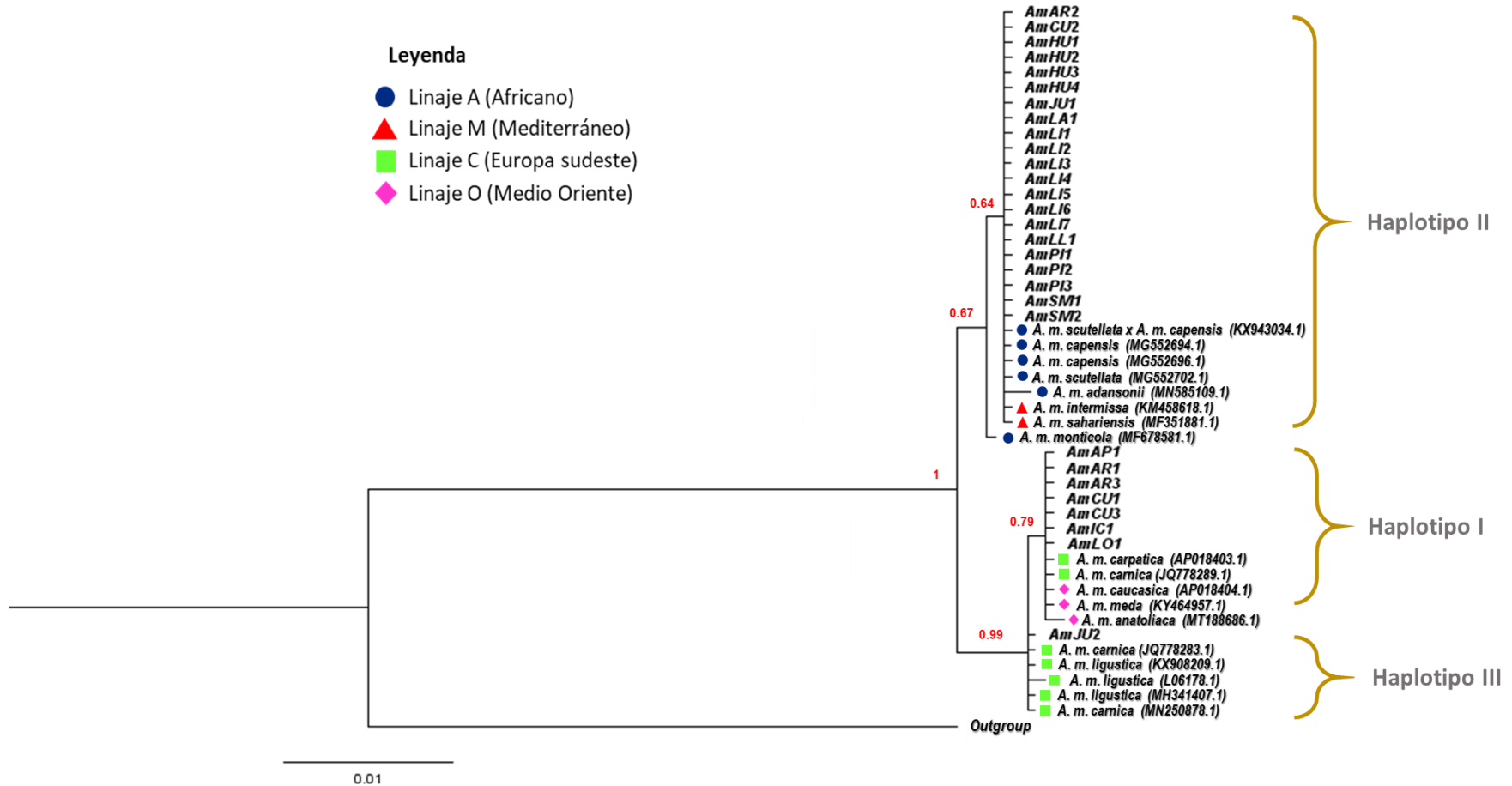


Figura 15. Relaciones filogenéticas para el marcador 16S rRNA inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY + I obtenidos de JModelTest bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC). Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

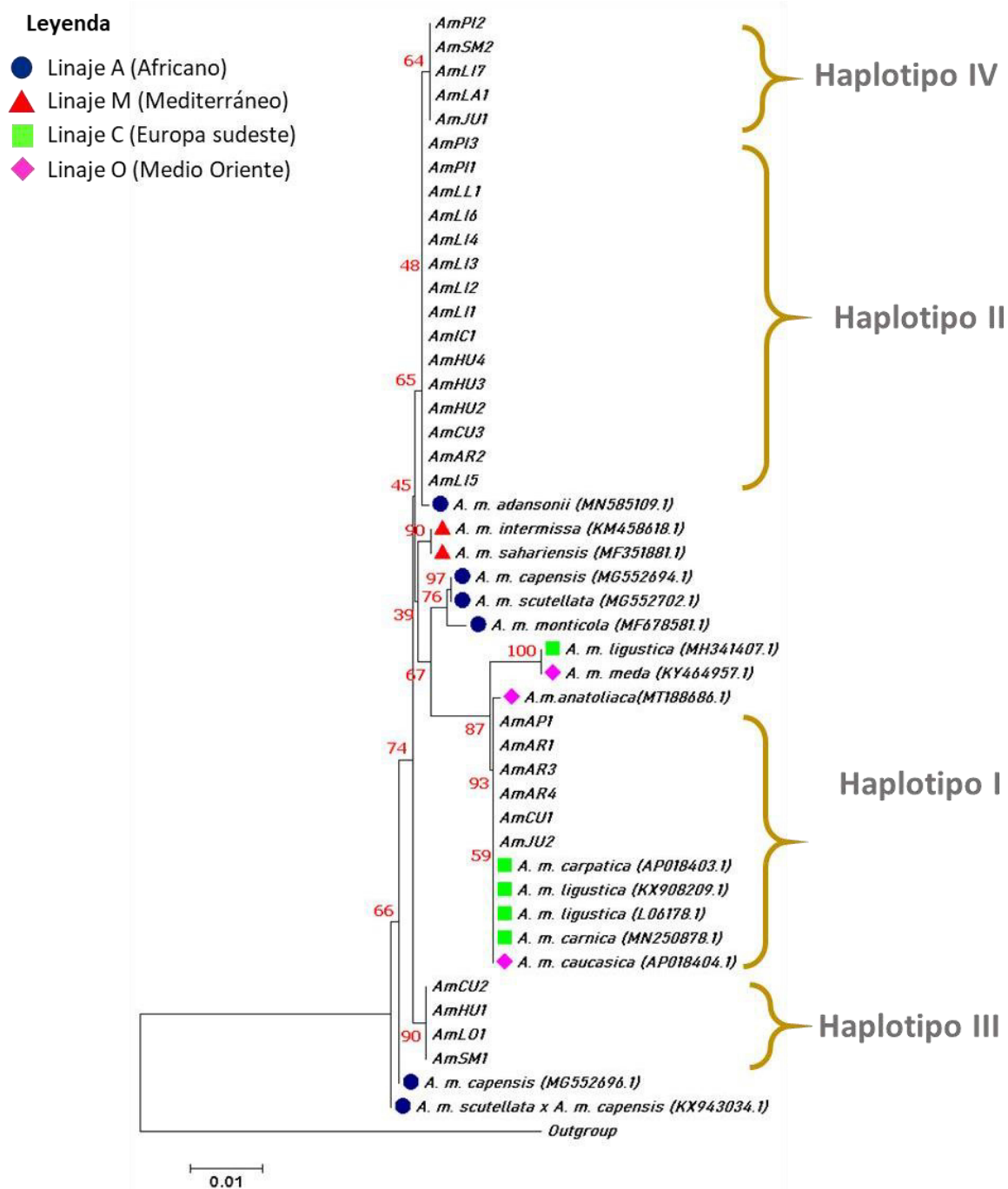


Figura 16. Relaciones filogenéticas para el marcador COI inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 30 secuencias nucleotídicas peruanas y 16 referencias del GenBank (tamaño de 980 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

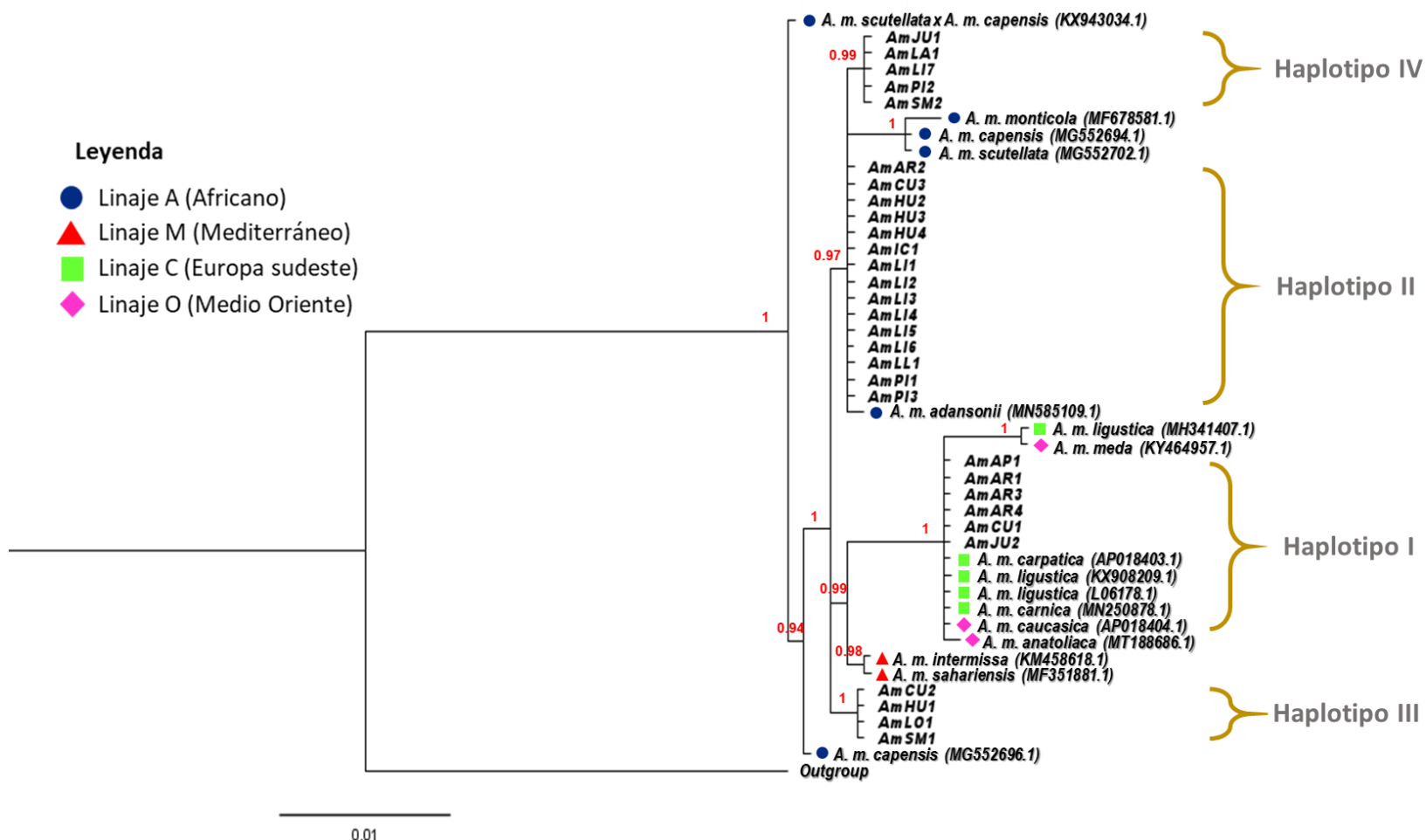


Figura 17. Relaciones filogenéticas para el marcador COI inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica GTR + I obtenidos de JModelTest bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC). Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

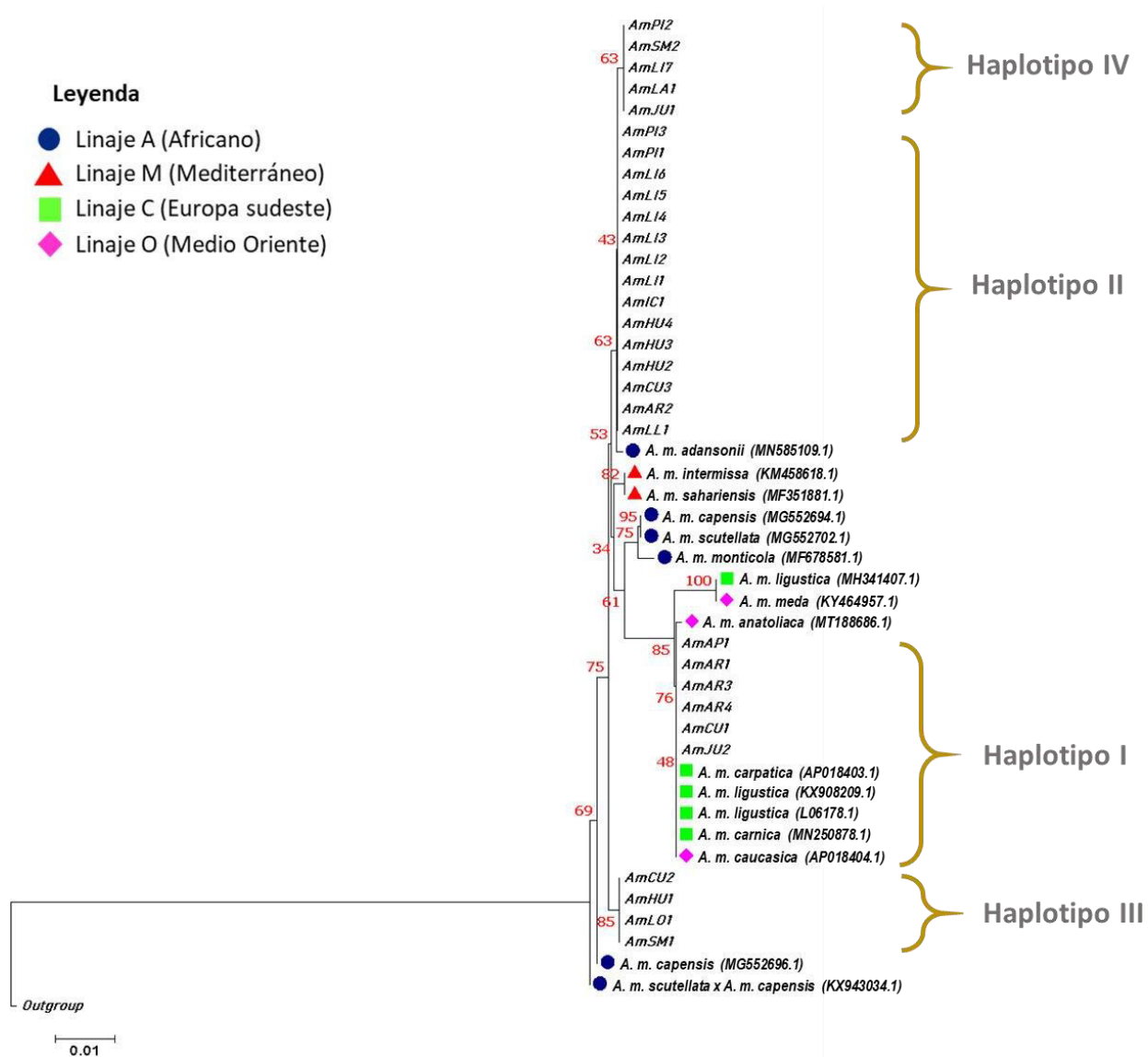


Figura 18. Relaciones filogenéticas para la matriz concatenada de los tres marcadores moleculares inferidas con el método Neighbor Joining. Se emplearon 30 secuencias nucleotídicas peruanas y 17 referencias del GenBank (tamaño de 2708 pb). Prueba de bootstrap de 1000 réplicas (valores resaltados en rojo). La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. Este árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

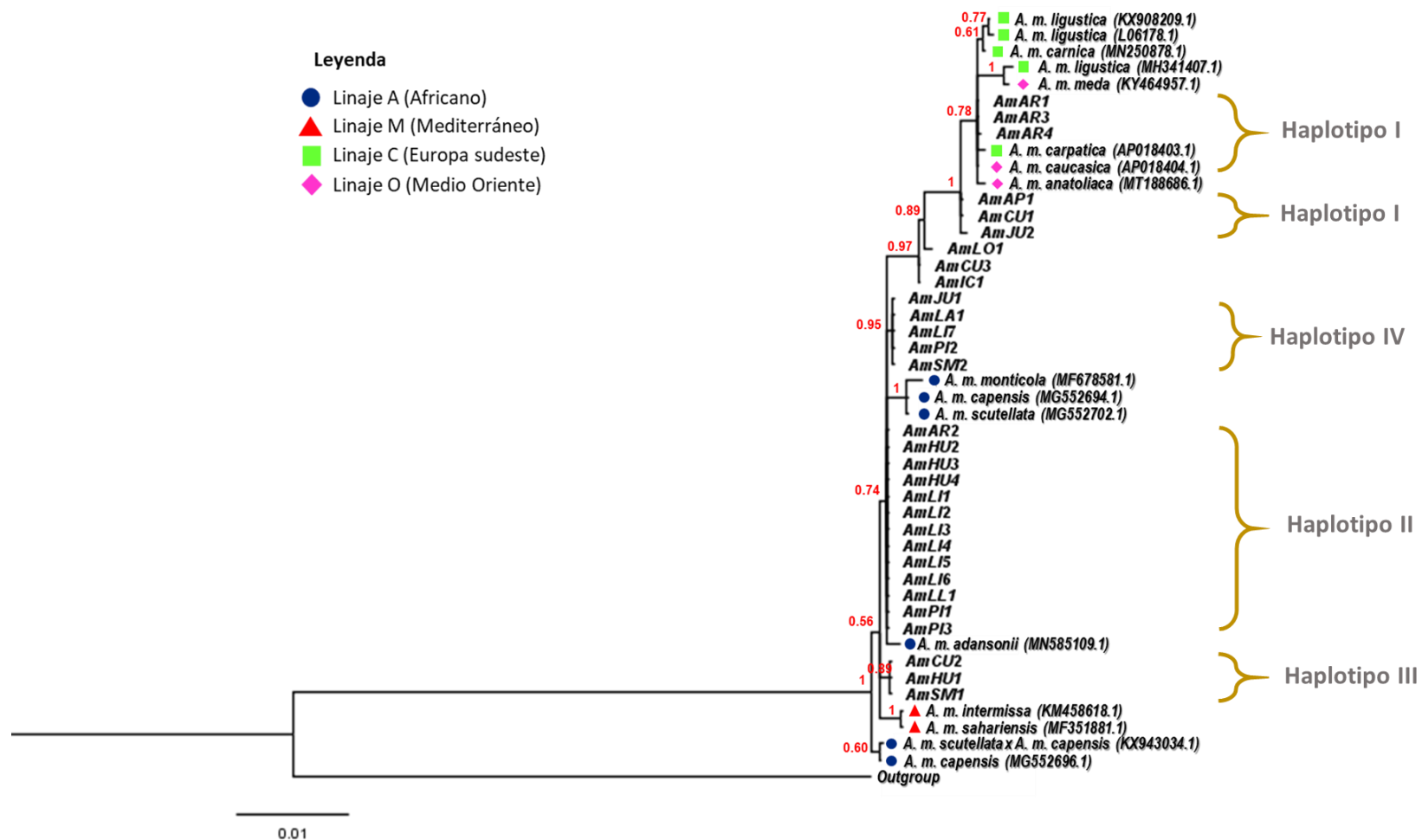


Figura 19. Relaciones filogenéticas para la matriz concatenada de los tres marcadores moleculares inferidas por el método de Inferencia Bayesiana. Análisis realizado según los parámetros del mejor modelo de sustitución nucleotídica TIM2 + G obtenidos con PartitionFinder. Se emplearon 10 000000 de M. C. M. C. en dos corridas independientes de 4 cadenas de Markov. Valores de PP resaltado en rojo. La escala representa la distancia genética en número de sustituciones por sitio. La leyenda indica el linaje al que corresponden las secuencias de referencia del GenBank. El árbol fue enraizado con el grupo externo *Apis cerana*.

5.4.4.5 Red de haplotipos – Network

En todas las redes de haplotipos se observó dos grupos, uno conformado por poblaciones de los linajes africano A y mediterráneo M, y el otro por los linajes europeo C y oriental O. Con las 44 secuencias analizadas para el gen ND5 se obtuvo un total de siete de haplotipos (HI - HVII), de los cuales, solo los HI, HII y HIII se encuentran distribuidos en el Perú. El HI es el más diverso respecto a las poblaciones que lo conforman y el más distribuido en la población peruana (26 poblaciones, frecuencia = 0.94); además, comprende poblaciones del linaje africano A y se separa por una mutación del HIV (también africano) (Figura 20). La región de Arequipa es la más diversa por tener los tres haplotipos ND5, donde HII (Chiguata) y HIII (Valle de Tambo), ambos formados por una sola muestra peruana, están emparentados con los linajes C y O, respectivamente (Figura 20).

El gen 16S rRNA tiene en total siete haplotipos (HI - HVII) con las 47 secuencias genéticas analizadas. Los primeros tres haplotipos se encuentran presentes en el Perú, donde el más común, el HII (21 poblaciones, frecuencia = 0.60), también está en poblaciones de los linajes africano A y mediterráneo M. El HI (frecuencia = 0.36) se distribuye en Apurímac, Ica, Loreto y en parte de Arequipa y Cusco. El HIII solo está en la población peruana de El Mantaro (Jauja - Junín) y también en poblaciones europeas (linaje C) tal como lo indica la red de haplotipos (Figura 21).

El marcador mitocondrial COI es el más diverso con un total de 12 haplotipos (46 secuencias analizadas) y con el mayor número de mutaciones entre un haplotipo y otro. En Perú, se distribuyen cuatro de estos (HI – HIV), donde los haplotipos I, II y III están formados en su totalidad por poblaciones peruanas. El HII es el más recurrente en la población peruana con una frecuencia de 0.41 y está emparentado con poblaciones africanas; además, está estrechamente relacionado con el HIV que surge a partir de una mutación. El HIII no tiene asociación con otro haplotipo y se separa por dos mutaciones del punto medio

del Network (punto establecido por el algoritmo empleado), éste está presente en Cusco, Huánuco, Loreto y San Martín. El HI presente en el sur del Perú, es el segundo haplotipo más frecuente y se encuentra relacionado con haplotipos de los linajes C y O. Con este marcador, Cusco es la ciudad más variable con tres de los haplotipos (HI, HII y HIII) (Figura 22).

Adicionalmente, se desarrolló una red de haplotipos con la matriz concatenada de los tres genes, lo que se obtuvo fue una topología idéntica a la obtenida con el marcador COI, el mismo número de haplotipos, las mismas poblaciones en cada uno y el mismo número de mutaciones entre un grupo y otro (Figura 23).

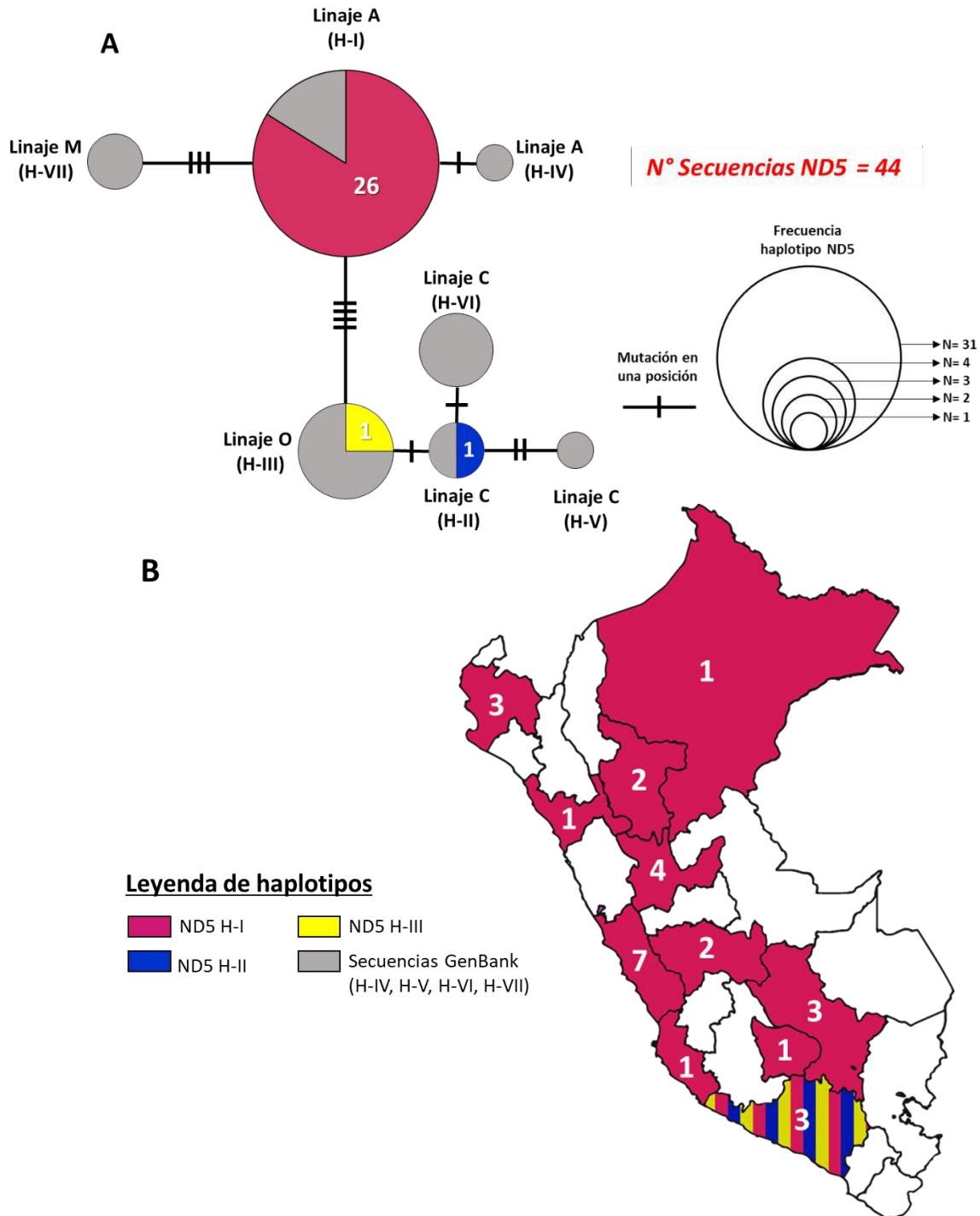


Figura 20. Haplotipos para el gen ND5. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (44 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos.

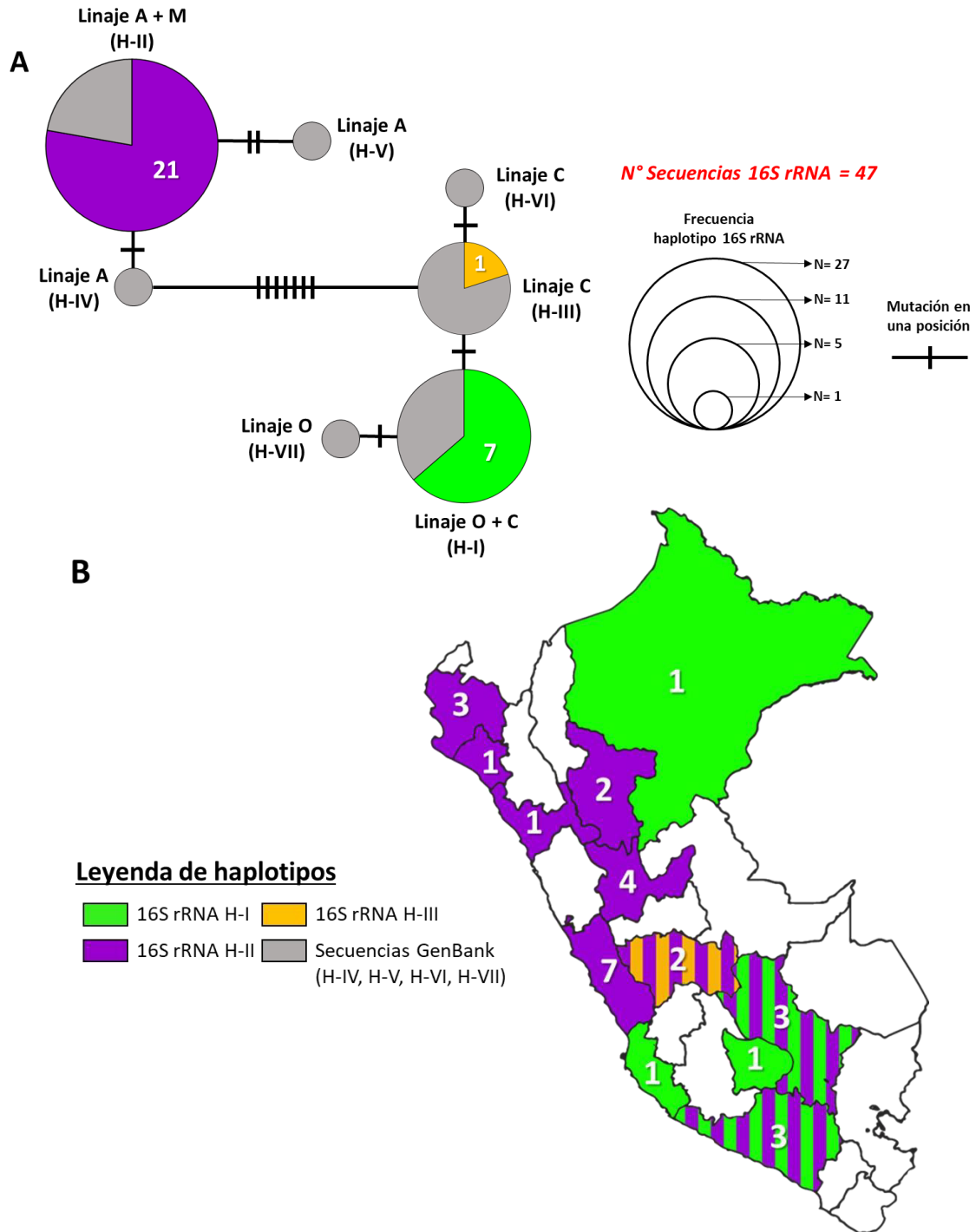


Figura 21. Haplotipos para el gen 16S rRNA. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (47 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos.

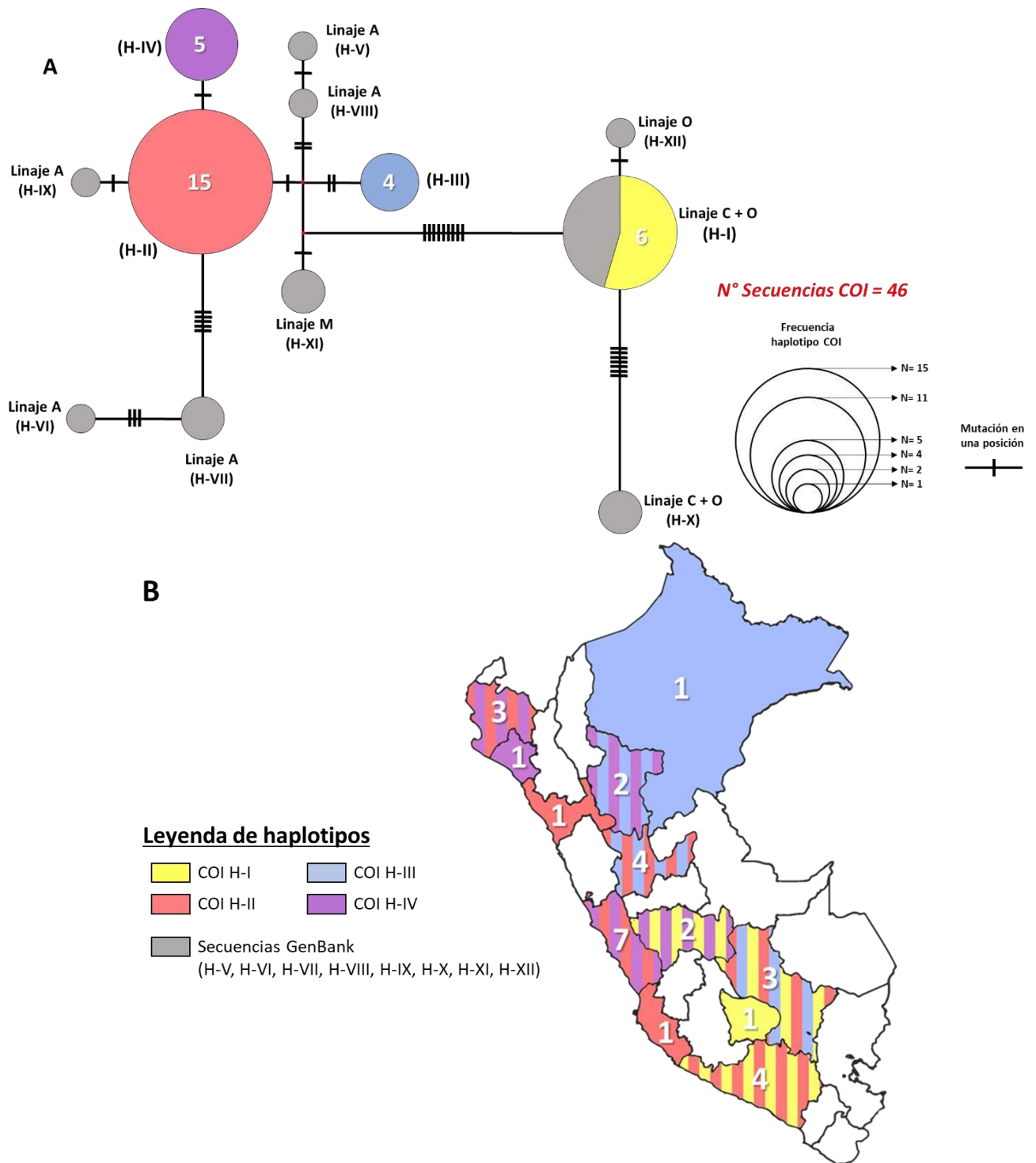


Figura 22. Haplotipos para el gen COI. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (46 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos.

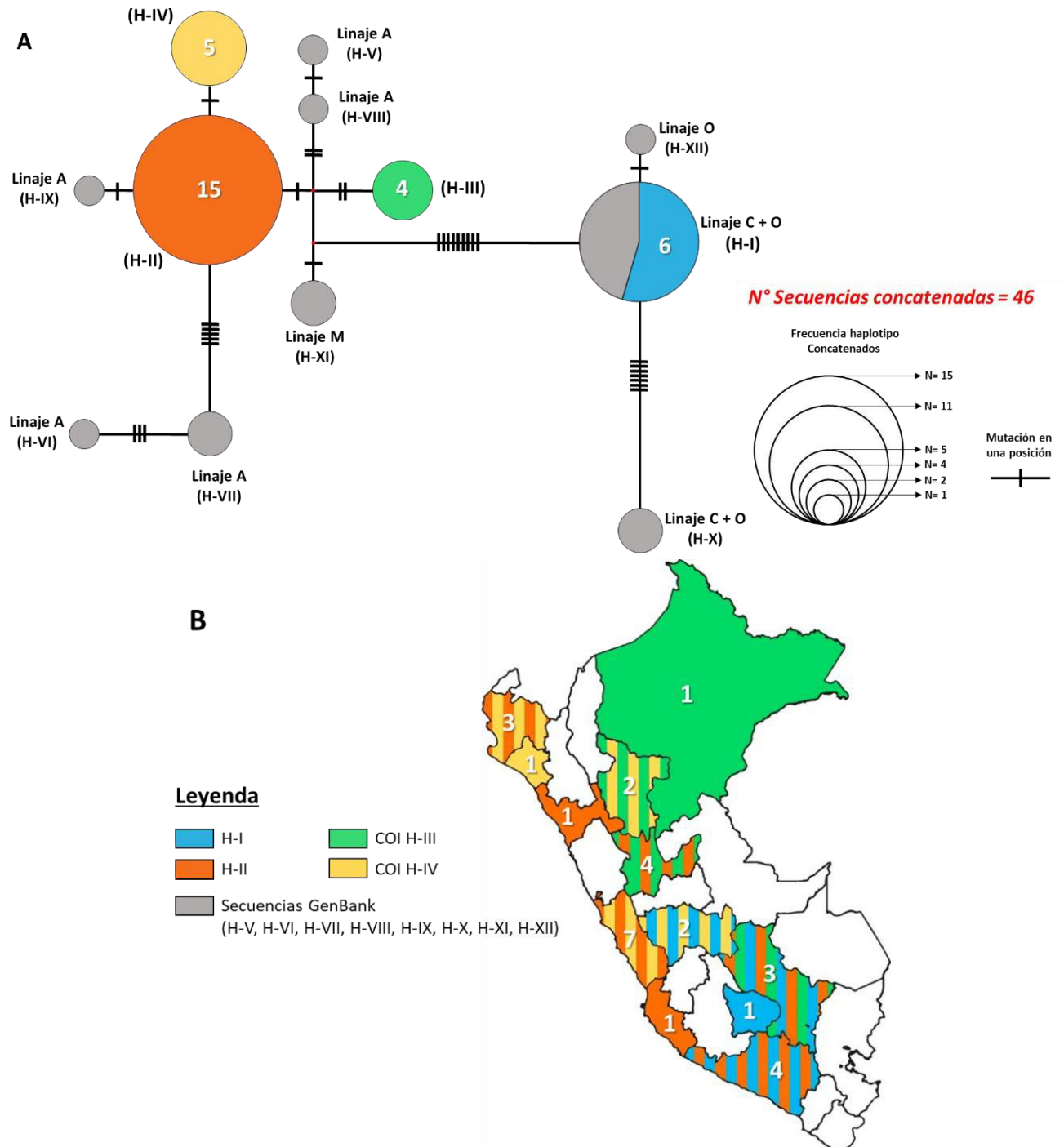


Figura 23. Haplotipos para la matriz concatenada de los 3 genes. (A) Red de haplotipos construida con el método Median – Joining en el programa Network 5.0.1.1 (46 secuencias genéticas). El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo y los números indican la frecuencia de las secuencias peruanas. (B) Mapa del Perú con regiones coloreadas según la presencia del haplotipo. Los números indican el número de secuencias analizadas en este estudio. Las líneas que conectan dichos haplotipos representan los eventos de mutación entre haplotipos.

6. DISCUSIÓN

Apis mellifera es una especie introducida que se ha distribuido en todo el territorio peruano por actividad antropogénica, la apicultura. A pesar de esta distribución y del importante rol de las abejas para la agricultura como principales polinizadores, no se tiene conocimiento de la variedad de razas o subespecies que aquí habitan, y tampoco hay registros del número total de colmenas instaladas desde el 2012, fecha del último censo realizado por el Ministerio de Agricultura del Perú (Ministerio de Agricultura y Riego 2015).

Con este trabajo se ha logrado un primer paso para conocer el estado de la diversidad genética de las poblaciones de *A. mellifera* en el Perú, así como sus relaciones de parentesco con razas de los linajes europeo y africano.

6.1 Diversidad genética

Nuestros resultados muestran una baja diversidad genética para las poblaciones peruanas cuando son evaluadas con los marcadores mitocondriales ND5 y 16S rRNA, esto se refleja en los bajos valores de diversidad haplotípica ($Hd_{ND5} = 0.140 \pm 0.008$ y $Hd_{16S\ rRNA} = 0.431 \pm 0.008$) y nucleotídica ($\pi_{ND5} = 0.001 \pm 0.0005$ y $\pi_{16S\ rRNA} = 0.004 \pm 0.0008$). Mientras que con el marcador COI la variabilidad haplotípica es mayor ($Hd = 0.687 \pm 0.004$), sin embargo, la π fue igualmente baja (0.005 ± 0.001). Estos hallazgos concuerdan con la conclusión de Bruford *et al.* (2003), quienes mencionan que la domesticación o crianza selectiva de colmenas disminuye la diversidad genética en las poblaciones, lo cual conlleva a una selección artificial de genes y a un posterior cuello de botella.

Al relacionar los valores de diversidad y las relaciones de parentesco mostradas en los árboles filogenéticos, se observa que los haplotipos con mayor frecuencia obtenidos para ND5 y 16S rRNA están emparentados estrechamente con dos linajes, uno africano (linaje A) y el otro mediterráneo (linaje M) (Figuras 12, 13, 14 y 15). Mientras que, los sub-clados obtenidos con el marcador COI muestran una agrupación diferente respecto a los linajes de

referencia incluidos en el árbol. De esta manera, los haplotipos II y IV que tienen una mayor frecuencia en los especímenes peruanos están relacionados con el linaje africano A según el árbol obtenido por BI (Figura 17).

Martimianakis *et al.* (2011) en su trabajo con abejas griegas emplearon los mismos marcadores ND5 y COI que empleamos en este estudio, encontrando una mayor diversidad genética con un número de haplotipos superior a nuestro hallazgo. Cabe mencionar que en dicho estudio emplearon un mayor número de especímenes y además que las abejas con las que trabajaron pertenecen a linajes propios (puros) de la zona, reafirmando la hipótesis postulada por Harpur *et al.* (2012), que indica que linajes puros presentan una mayor diversidad genética. Asimismo, el grupo de Martimianakis encontró que el marcador COI fue más variable genéticamente que el marcador ND5, lo que concuerda con nuestros hallazgos.

Es generalmente aceptado que las poblaciones mantengan altos valores de diversidad genética, la cual se mide a través de diferentes parámetros como S , h , Hd y π , para que desarrollen las características adaptativas que les permitan responder y enfrentarse a las necesidades de su entorno y así preservar su especie (Frankham *et al.* 2009). Los bajos valores de diversidad genética reportados por nuestro estudio podrían ser el reflejo del alto grado de cruzamiento indiscriminado que tienen las poblaciones de abejas manejadas en el Perú.

6.2 Relaciones Filogenéticas

Los árboles filogenéticos por Neighbor Joining y por Inferencia Bayesiana muestran topologías no resueltas debido a la presencia de ramas con politomías. A pesar de ello, nuestros resultados reflejan que gran parte de las muestras estudiadas comparten un ancestro común con los linajes africano A y europeo M, agrupándose dentro de un mismo grupo.

Han *et al.* (2012) como parte de su trabajo para conocer el origen de las abejas, estudiaron las relaciones filogenéticas entre las diferentes subespecies empleando marcadores nucleares SNPs. Los autores obtuvieron un árbol NJ con dos grupos, uno conformado por las subespecies africana y mediterráneo de los linajes A y M, respectivamente; y el otro con los linajes oriental O y europeo C, reforzando así nuestros resultados. También, concluyeron que los linajes A y M se originaron a partir de un ancestro híbrido (Figuras 12, 13, 14, 15, 16 y 17).

Un estudio con enzimas de restricción sobre la región mitocondrial COI - COII en muestras de Brasil y Uruguay revelaron una elevada frecuencia (68%) de patrones africanos y en menor proporción el patrón europeo de los linajes M y C (Collet *et al.* 2006).

Pérez (2009) realizó un estudio similar al anterior con enzimas de restricción sobre dos genes de ADN mitocondrial en abejas peruanas, determinando así un alto grado de africanización de las mismas; es decir, una alta presencia de la variedad africana.

Estos estudios confirman nuestros resultados sobre las relaciones filogenéticas de las secuencias peruanas en su mayoría agrupadas con subespecies del linaje africano A. Además, con los hallazgos de Pérez (2009), se puede concluir que las muestras peruanas tendrían un origen híbrido: africano y mediterráneo, producto de la crianza selectiva que busca obtener colmenas dóciles y productivas. El autor también señala que en nuestro país a medida que la latitud y altitud aumenta, disminuye la presencia de las abejas de origen africano, esta hipótesis no concuerda con nuestros hallazgos ya que observamos la presencia de abejas africanizadas en regiones muy elevadas del Perú (>3000 m.s.n.m.).

Es de importancia conocer el porcentaje de contribución de cada linaje (europeo y africano) en nuestras colmenas; por ello, se debe realizar mayores estudios de estructura poblacional con marcadores moleculares nucleares como los microsatélites (Bruford *et al.* 2003).

6.3 Redes de Haplotipos

Con la red de haplotipos para el gen ND5 surge la hipótesis de que el haplotipo I origina al haplotipo III por cuatro mutaciones. Este evento puede relacionarse con el concepto de efecto fundador en el que por acción antropogénica (apicultores) algunos individuos de cualquiera de las regiones que presentan el HI (lo más seguro es Arequipa) hayan sido trasladados a la zona de Valle de Tambo (presenta el HIII) (Figura 20 A). Además, se reafirman nuestros resultados, al observar que en más del 90% de las regiones peruanas muestreadas predomina el HI (Figura 20 B).

La distribución haplotípica para el gen 16S rRNA sugiere que el haplotipo II pudo dar origen al haplotipo III (distancia de siete mutaciones) presente en una población de Junín (Figura 21 A). Este marcador tiene una mayor variación en la distribución de sus haplotipos en las regiones estudiadas respecto al marcador ND5 (Figura 21 B).

Por otro lado, según la red de haplotipos obtenidos para el gen COI, así como con la matriz concatenada, se observa que dos de los haplotipos (HI y HIII) son independientes y no se relacionan con los HII y HIV. De estos últimos, el HII da origen al haplotipo IV, el cual se diferencia por una mutación (Figura 22 A). Cuando Martimianakis *et al.* (2011) trabajaron con la matriz concatenada para formar la red de haplotipos encontraron la presencia de un mayor número de grupos en relación al trabajo con cada marcador independientemente. Sin embargo, nuestro trabajo no refleja una variación entre el número y distribución de haplotipos cuando se trabaja con la matriz concatenada de los tres marcadores mitocondriales (Figura 23).

De acuerdo a nuestros hallazgos, el marcador mitocondrial COI es capaz de distinguir con mayor claridad los polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de poblaciones peruanas y las relaciones de ancestría; además, evidencia haplotipos peruanos únicos que no tienen orígenes en común con los linajes reportados en el mundo. Este marcador tiene una alta

reproducibilidad y una fácil amplificación y detección en el laboratorio, lo que lo convierte en un candidato potencial para el estudio de la variabilidad genética en las poblaciones de abejas con aguijón en nuestro país (Singh *et al.* 2017).

La prueba de neutralidad de Tajima no resultó significativa de acuerdo al *p-value* para los tres marcadores empleados, lo que se interpreta como, la especie proviene de una población ancestral suficientemente grande y estable. Se hace notar que este resultado corresponde al análisis de todas las secuencias concatenadas (4 haplotipos) obtenidas en el presente estudio junto con otras correspondientes a todos los linajes de *A. mellifera*, con las que presentan diferencias de entre una o nueve mutaciones, lo que no resulta en una red de haplotipos en estrella que es una firma de poblaciones que pasaron por un fuerte cuello de botella genético seguido de una rápida expansión (Anducho-Reyes *et al.* 2008).

6.4 Factor antropogénico en la disminución de la diversidad genética

Los resultados en este trabajo muestran una baja diversidad genética en los especímenes analizados, esto podría ser resultado de una apicultura no controlada y con deficiencia en su sistema de reproducción artificial debido a la falta del conocimiento básico.

Leclercq *et al.* (2018) señalan que hoy en día la manipulación humana viene reformando la diversidad genética de las abejas por la importación constante de razas para mejorar la producción de miel en las colmenas, así como su comportamiento. Estas condiciones generan un beneficio a corto plazo llamado heterosis donde el mejoramiento selectivo por conveniencia genera nuevas combinaciones alélicas en los individuos bajo el modelo de la deriva génica (cambios no adaptativos). Este postulado se ha reflejado en nuestros hallazgos con el análisis de Tajima con el que se sugiere que los eventos evolutivos en nuestras poblaciones de abejas no son producto de la selección natural.

La desventaja de la heterosis es que conllevan a la pérdida de la diversidad genética en las poblaciones generadas tal como lo muestran nuestros resultados, afectando el fitness y la

supervivencia de las colmenas y no se descarta que este evento pueda contribuir al Síndrome de Colapso de Colmenas (CCD) que viene afrontando el mundo (Murray *et al.* 2009; Dennis *et al.* 2017; Kumar 2018).

7. CONCLUSIONES

- Existe una baja diversidad haplotípica y nucleotídica en las poblaciones de *A. mellifera* en el Perú.
- Las mutaciones de las secuencias de mtDNA estudiadas carecen de respaldo estadístico para evidenciar la influencia de la evolución neutral o la selección natural.
- Las poblaciones peruanas de abejas se encuentran, en su mayoría, relacionadas filogenéticamente con el linaje africano A.
- El marcador molecular COI fue el más informativo respecto a los otros marcadores empleados ND5 y el 16S rRNA, representado en los resultados de diversidad genética y estructura de la topología en el árbol filogenético por IB, haciéndolo el mejor candidato para posteriores estudios.
- Las poblaciones de abejas de Arequipa serían las de mayor diversidad genética.

8. RECOMENDACIONES

Nuestros hallazgos refuerzan la idea de que es necesario un mejor programa de cruzamientos por la industria apícola en el Perú, que ayuden a mantener la diversidad genética de la especie. Para ello es necesario mayores estudios con un mayor número de muestras y que puedan ser complementados con estudios morfológicos para una mejor caracterización de las poblaciones de abejas en el país. Postulamos el marcador mitocondrial COI como mejor candidato para futuros estudios.

Asimismo, debido a la gran importancia de esta especie en nuestro país para el desarrollo de la apicultura tradicional, así como la fertilización de los campos agrícolas, es necesario implementar un plan de conservación para esta especie que implique un mejor manejo de las colmenas a mayor escala con la finalidad de reducir el impacto del Síndrome de Colapso de Colmenas (CCD) en nuestro país.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU, H., 2014. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: A review. *Veterinarni Medicina*, vol. 59, no. 1, pp. 1-10. DOI 10.17221/7240-VETMED.
- ALAJMI, R., ABDEL, R. & ALFOZANA, L., 2019. Molecular insights of mitochondrial 16S rDNA genes of the native honey bees subspecies *Apis mellifera* carnica and *Apis mellifera jementica* (Hymenoptera : Apidae) in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, vol. 18, no. 3. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039948>.
- ALTSCHUP, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. & LIPMAN, D., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410.
- ANDUCHO-REYES, M.A., COGNATO, A.I., HAYES, J.L. & ZÚÑIGA, G., 2008. Phylogeography of the bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 49, no. 3, pp. 930-940. ISSN 1055-7903. DOI 10.1016/j.ympev.2008.09.005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2008.09.005>.
- ARIAS, C., RINDERER, T. & SHEPPARD, W., 2006. Further characterization of honey bees from the iberian peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *Journal of Apicultural Research*, vol. 45, no. 4, pp. 188-196. DOI 10.1080/00218839.2006.11101346.
- ARIAS, M. & SHEPPARD, W., 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 5, no. 3, pp. 557-566. DOI 10.1006/mpev.1996.0050.
- AVISE, J., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sunderland, MA: s.n. ISBN 0-87893-041-8. Disponible en: www.sinauer.com.
- AVISE, J., 2009. Phylogeography : retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, vol. 36, no. 1, pp. 3-15. DOI 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x.
- BADINO, G., CELEBRANO, G., MANINO, A. & IFANTIDIS, M., 1988. Allozyme variability in Greek honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, vol. 19, no. 4, pp. 377-386.
- BANDELT, H., FORSTER, P. & ROHL, A., 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 16, no. 1, pp. 37-48.
- BEHURA, S., HALL, M. & Y AVENUE, S., 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, vol. 15, no. 11, pp. 3087-3113. DOI 10.1111/j.1365-294X.2006.03014.x.
- BEKIC, B., JELOCNIK, M. & SUBIC, J., 2014. Honey bee Colony Collapse Disorder (*Apis mellifera* L.) - possible causes. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, vol. 14, no. 2, pp. 13-18.
- BOUGA, M., HARIZANIS, P., KILIAS, G. & ALAHOTIS, S., 2005. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR – RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, vol. 36, no. 3, pp. 335-344. DOI 10.1051/apido:2005021.
- BRACK, A., 1986. *Ecología de un país complejo*. II. Barcelona, España: Gran Geografía del Perú. Naturaleza y Hombre.
- BRUFORD, M., BRADLEY, D. & LUIKART, G., 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, vol. 4, no. 11, pp. 900-910. DOI 10.1038/nrg1203.
- CHALINE, A., RATNIEKS, L. & BURKE, T., 2002. Anarchy in the UK : Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honeybee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites. *Molecular Ecology*, vol. 11, no. 9, pp. 1795-1803.
- CHAMBERS, G. & MACAVOY, E., 2000. Microsatellites: consensus and controversy.

- Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 126, no. 4, pp. 455-476.
- CHAPMAN, R., 1998. *The insects: Structure and function*. S.I.: Cambridge University press. ISBN 9780521570480.
- CHÁVEZ, J., 2016. *Population genomics and landscape genetics of the Iberian honey bee (Apis mellifera iberiensis)*. S.I.: Universidad de Minho.
- COLLET, T., FERREIRA, K., ARIAS, M., SOARES, A. & DEL LAMA, M., 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI – COII patterns. *Heredity*, vol. 97, no. 5, pp. 329-335. DOI 10.1038/sj.hdy.6800875.
- COMBARROS, P., ESTEVINHO, L., DIAS, L., CASTRO, J., TOMAS, F., TORNADIJO, M. & FRESNO, J., 2018. Bioactive components, antioxidant and antibacterial activities of different varieties of honey: a screening prior to clinical application. *Journal of Agricultural and food chemistry*, vol. 67, no. 2, pp. 688-698. DOI 10.1021/acs.jafc.8b05436.
- CONTRERAS, F., PÉREZ, B., ECHAZARRETA, C., CAVAZOS, J., MACÍAS, J. & TAPIA, M., 2013. Características y situación actual de la apicultura en las regiones Sur y Sureste de Jalisco, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, vol. 4, no. 3, pp. 387-398.
- CRIDLAND, J., TSUTSUI, N. & RAMÍREZ, S., 2017. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Biology and Evolution*, vol. 9, no. 2, pp. 457-472. DOI 10.1093/gbe/evx009.
- CROZIER, R. & CROZIER, Y., 1993. The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics*, vol. 133, no. 1, pp. 97-117.
- DALL-OLIO, R., MARINO, A., LODESANI, M. & MORITZ, R., 2007. Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie*, vol. 38, no. 2, pp. 207-217.
- DE-RÚA, P., 1999. *Variabilidad genética , análisis molecular y filogenia de poblaciones ibéricas y canarias de Apis mellifera (Linneo 1758) (Hymenoptera : Apidae)*. S.I.: s.n.
- DENNIS, V., KRISTEN, T., MICHAEL, A., ELINOR, L., YANPING, C., CLAUDE, S. & DIANA, C.-F., 2017. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 7, pp. 1-23. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179535> July.
- EDGAR, R., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, vol. 32, no. 5, pp. 1792-7. DOI 10.1093/nar/gkh340.
- EGUIARTE, L., SOUZA, V. & AGUIRRE, X., 2007. *Ecología Molecular*. First edit. México, DF.: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. ISBN 978-968-817-839-3.
- ENGEL, M. & SCHULTZ, T., 1997. Phylogeny and Behavior in Honey Bees (Hymenoptera : Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 90, no. 1, pp. 43-53.
- ESTOUP, A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J., 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, vol. 140, no. 2, pp. 679-695. DOI 10.1089/hum.2006.17.1165.
- FAOSTAT, 2019. Production of natural honeybee. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783-791.
- FRANCK, P., GARNERY, L., LOISEAU, A., OLDROYD, B., HEPBURN, H., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J., 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and

- mitochondrial data. *Heredity*, vol. 86, no. 4, pp. 420-430. DOI 10.1046/j.1365-2540.2001.00842.x.
- FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M., 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from Near East. *Apidologie*, vol. 31, pp. 167-180. ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J., BRISCOE, D. & MCINNES, K., 2009. *Introduction to Conservation Genetics*. Second. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. ISBN 9780521702713.
- GALLAI, N., SALLES, J., SETTELE, J. & VAISSIÈRE, B., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, vol. 68, no. 3, pp. 810-821. DOI 10.1016/j.ecolecon.2008.06.014.
- GARNERY, L., CORNUET, J. & SOLIGNAC, M., 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, vol. 1, no. 3, pp. 145-154. DOI 10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.x.
- GIFFORD, C., 2011. *Colony collapse disorder. The vanishing honeybee (Apis mellifera)*. S.I.: University of Colorado at Boulder.
- GONZÁLEZ, E., 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, vol. 59, no. 2-3, pp. 377-388.
- GOODRICH, A. & SNODGRASS, R., 2006. Principles of Insect Morphology. *Transactions of the American Microscopical Society*, vol. 55, no. 1, pp. 102. DOI 10.2307/3223017.
- GUPTA, R., KHAN, M., SRIVASTAVA, R. & GOSWAMI, V., 2014. Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security. *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security*. S.I.: s.n., pp. 3-62.
- HALL, H., 1990. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics*, vol. 125, no. 3, pp. 611-621. ISSN 00166731.
- HAN, F., WALLBERG, A. & WEBSTER, M., 2012. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and Evolution*, vol. 2, no. 8, pp. 1949-1957. DOI 10.1002/ece3.312.
- HANCOCK, A. & DI-RIENZO, A., 2008. Detecting the Genetic Signature of Natural Selection in Human Populations: Models, Methods, and Data. *Annual Review of anthropology*, vol. 37, pp. 197-217. DOI 10.1146/annurev.anthro.37.081407.085141. Detecting.
- HARPUR, B., MINAEI, S., KENT, C. & ZAYED, A., 2012. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology*, vol. 21, no. 18, pp. 4414-4421. DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05614.x.
- HEBERT, P., CYWINSKA, A., BALL, S. & DEWAARD, J., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, vol. 270, no. 1512, pp. 313-321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- HEIMPEL, G. & DE BOER, J., 2008. Sex Determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, vol. 53, pp. 209-230. DOI 10.1146/annurev.ento.53.103106.093441.
- HILMI, M., BRADBPEAR, N. & MEJIA, D., 2011. *Beekeeping and sustainable livelihoods Beekeeping and sustainable*. Second. Rome: s.n. ISBN 9789251070628.
- HOLLOWAY, B., SYLVESTER, H., BOURGEOIS, L. & RINDERER, T., 2012. Association of single nucleotide polymorphisms to resistance to chalkbrood in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, vol. 51, no. 2, pp. 154-163. DOI 10.3896/IBRA.1.51.2.02.
- HUELSENBECK, J. & RONQUIST, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, vol. 17, no. 8, pp. 754-755. DOI 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- HUSON, D. & SCORNAVACCA, C., 2010. A Survey of Combinatorial Methods for

- Phylogenetic Networks. *Genome Biology and Evolution*, vol. 3, pp. 23-35. DOI 10.1093/gbe/evq077.
- ITC-TRADE MAP, 2019. List of importing markets for the product exported by Peru in 2019. Product: 0409 Natural honey. [Consulta: 27 junio 2020]. Disponible en: https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx?nvpm=1%7C604%7C%7C%7C0409%7C%7C%7C4%7C1%7C1%7C2%7C1%7C1%7C2%7C2%7C1%7C1.
- JEAN-PROST, P., MÉDORY, P. & LE CONTE, Y., 2007. *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. 4a edición. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. ISBN 84-8476-204-1.
- JUKES, T. & CANTOR, C., 1969. Evolution of protein molecules. En: H.N. MUNRO (ed.), *Mammalian protein metabolism*. III. New York and London: Academic press, Inc., pp. 22-176.
- KAMAKURA, M., 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, vol. 473, no. 7348, pp. 478-483. DOI 10.1038/nature10093.
- KASKINOVA, M. & NIKOLENKO, A., 2017. csd Gene of Honeybee: Genetic Structure, Functioning, and Evolution. *Russian Journal of Genetics*, vol. 53, no. 3, pp. 297-301. DOI 10.1134/S1022795417010070.
- KENT, R., 1988. The Introduction and Diffusion of the African Honeybee in South America. *Yearbook of the Association of Pacific Coast Geographers*, vol. 50, no. 1, pp. 21-43. DOI 10.4324/9780429490323-1.
- KLEIN, A., VAISSIÈRE, B., CANE, J., STEFFAN, I., CUNNINGHAM, S., KREMEN, C. & TSCHARNTKE, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, vol. 274, no. 1608, pp. 303-313. ISSN 14712970. DOI 10.1098/rspb.2006.3721.
- KUMAR, S., STECHER, G. & TAMURA, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 33, no. 7, pp. 1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- KUMAR, S.S., 2018. Colony Collapse Disorder (CCD) in Honey Bees Caused by EMF Radiation. *Bioinformatics*, vol. 14, no. 9, pp. 521-524. DOI 10.6026/97320630014521.
- LANFEAR, R., FRANSEN, P., WRIGHT, A., SENFELD, T. & CALCOTT, B., 2018. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 34, no. 3, pp. 772-773. DOI 10.1093/molbev/msw260.
- LECLERCQ, G., GENGLER, N. & FRANCIS, F., 2018. How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. *Faunistic Entomology*, no. 2, pp. 1-13.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, vol. 25, no. 11, pp. 1451-1452. DOI 10.1093/bioinformatics/btp187.
- LÓPEZ, M. & SIMONE, M., 2019. Special Issue: Honey Bee Research in the US: Current State and Solutions to Beekeeping Problems. *Insects*, vol. 10, no. 1, pp. 22. DOI 10.3390/insects10010022.
- MADDISON, W. & MADDISON, D., 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Disponible en: <http://www.mesquiteproject.org>.
- MARKERT, C. & MOLLER, F., 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 45, no. 5, pp. 753-763.
- MARTIMIANAKIS, S., KLOSSA, E., BOUGA, M. & KILIAS, G., 2011. Phylogenetic relationships of Greek *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mtDNA segments (COI and ND5). *Journal of Apicultural Research*, vol. 50, no. 1, pp. 42-50. DOI 10.3896/IBRA.1.50.1.05.

- MEIXNER, M., PINTO, M., BOUGA, M., KRYGER, P., IVANOVA, E. & FUCHS, S., 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, vol. 52, no. 4, pp. 1-28. DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.05.
- MEIXNER, M., SHEPPARD, W., DIETZ, A. & KRELL, R., 1994. Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie*, vol. 25, no. 2, pp. 188-202. DOI 10.1051/apido:19940207.
- MENDIZABAL, F., 2005. *Abejas*. 1a edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros. ISBN 950-24-1070-X.
- MERCADO, K., 2014. *Caracterización de la Producción Apícola en ocho distritos de las provincias de Jauja, Concepción y Chupaca de la región Junín*. S.I.: Universidad Nacional del Centro del Perú.
- MICHENER, C., 1944. Comparative External Morphology, Phylogeny, and a Classification of the Bees (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 82, pp. 1-326. DOI 10.1109/AICT-ICIW.2006.40.
- MICHENER, C., 2007. *The Bees of the World*. 2nd ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press. ISBN 10: 0-8018-8573-6.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2011. *Propuesta del Plan Nacional de Desarrollo Apícola*. 2011. Perú: s.n. 156-2011-pcm.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO, 2015. Plan Nacional de Desarrollo Apícola 2015-2025 (Lima-Perú). http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/marcolegal/normaslegales/resolucionesministeriales/2015/abril/plan_rm125-2015-minagri.pdf.
- MOUSSET, S., DEROME, N. & VEUILLE, M., 2004. A Test of Neutrality and Constant Population Size Based on the Mismatch Distribution, pp. 724-731. DOI 10.1093/molbev/msh066.
- MURRAY, T., KUHLMANN, M. & POTTS, S., 2009. Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie*, vol. 40, no. 3, pp. 211-236. DOI 10.1051/apido/2009015.
- NASCIMENTO, F., REIS, M. & YANG, Z., 2017. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nature ecology and Evolution*, vol. 1, no. 10, pp. 1446-1454. DOI 10.1038/s41559-017-0280-x.A.
- NATES, G., 2011. Genética del comportamiento: abejas como modelo. *Acta Biológica Colombiana*, vol. 16, no. 3, pp. 213-230.
- NEI, M., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, vol. 76, no. 10, pp. 5269-5273.
- NEUMANN, P., MORITZ, R. & MAUTZ, D., 1999. Using DNA microsatellites for maternity testing in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, vol. 30, no. 5, pp. 505-512.
- NIELSEN, D., EBERT, P., HUNT, G., GUZMÁN, E., KINNEE, S. & PAGE, R., 1999. Identification of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) incorporating morphometrics and an improved polymerase chain reaction mitotyping procedure. *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 92, no. 2, pp. 167-174. DOI 10.1093/aesa/92.2.167.
- NIELSEN, D., PAGE, R. & CROSLAND, M., 1994. Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations. *Experientia*, vol. 50, no. 9, pp. 867-871. DOI 10.1007/BF01956474.
- NIKOLOVA, S., 2011. Genetic Variability of Local Bulgarian Honey Bees *Apis mellifera macedonica* (rodopica) Based on Microsatellite DNA Analysis. *Journal of Apicultural Science*, vol. 55, no. 2, pp. 117-129.
- NUNAMAKER, R. & WILSON, W., 1981. Comparison of MDH Allozyme Patterns in the African Honey Bee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the Africanized Populations of

- Brazil. *Journal of the Kansas Entomological Society*, vol. 54, no. 4, pp. 704-710.
- OLDROYD, B., 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biology*, vol. 5, no. 6, pp. 1195-1199. DOI 10.1371/journal.pbio.0050168.
- OSTROVERKHOVA, N., KONUSOVA, O., KUCHER, A. & KIRIEVA, T., 2016. Investigation of Polyandry in Honey Bees (*Apis mellifera*) using Microsatellites. *Entomological review*, vol. 96, no. 4, pp. 389-394. DOI 10.1134/S0013873816040011.
- PAREJO, M., HENRIQUES, D., PINTO, M. & SOLAND, G., 2018. Empirical comparison of microsatellite and SNP markers to estimate introgression in *Apis mellifera mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, vol. 57, no. 4, pp. 504-506. DOI 10.1080/00218839.2018.1494894.
- PASUPULETI, V., SAMMUGAM, L., RAMESH, N. & GAN, S., 2017. Review Article Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*. DOI 10.1155/2017/1259510.
- PATRICIA, P., ALLISON, S., MALCOLM, S., GREGORY, B. & PAUL, F., 1998. WHAT MOLECULES CAN TELL US ABOUT POPULATIONS : CHOOSING AND USING A MOLECULAR MARKER. *Ecological Society of America*, vol. 79, no. 2, pp. 361-382.
- POSADA, D., 2003. *jModelTest : Phylogenetic Model Averaging*. 2003. S.I.: s.n.
- POTTS, S., BIESMEIJER, J., KREMEN, C., NEUMANN, P., SCHWEIGER, O. & KUNIN, W., 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 25, no. 6, pp. 345-353. DOI 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- RAMBAUT, A., 2006. *Figtree: Tree Figure Drawing Tool*. 2006. S.I.: s.n. 1.4.0.
- RUTTNER, F.; TASSENCOURT, J. & LOUVEAUX, J., 1978. Biometrical - Statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, vol. 9, no. 4, pp. 363-381.
- RUTTNER, F., 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. 1st editio. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN 9783642726514.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 4, pp. 406-425.
- SAMMATARO, D. & AVITABILE, A., 1978. *The Beekeeper's Handbook*. Michigan: Peach Mountaib Press,ltd. ISBN 9077073574.
- SANCHEZ, C., CASTIGNANI, H. & RABAGLIO, M., 2018. El Mercado Apícola Internacional. [en línea]. Buenos Aires, Argentina: Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/inta>.
- SEELEY, T., 1995. *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. S.I.: Harvard University Press. ISBN 0-67495376-2.
- SHEPPARD, W. & BERLOCHER, S., 1989. Allozyme variation and differentiation among four *Apis* species. *Apidologie*, vol. 20, pp. 419-431.
- SINGH, S., MISHRA, V. & BHOI, T., 2017. Insect Molecular Markers and its Utility-A Review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, vol. 10, no. 4, pp. 469. DOI 10.5958/2230-732x.2017.00058.4.
- SMITH, D. & GLENN, T., 1995. Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, vol. 86, no. 1, pp. 12-16. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111518.
- STRAUSS, U., HUMAN, H., GAUTHIER, L., CREWE, R., DIETEMANN, V. & PIRK, C., 2013. Seasonal prevalence of pathogens and parasites in the savannah honeybee (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 114, no. 1, pp. 45-52. DOI 10.1016/j.jip.2013.05.003.
- STUCKY, B., 2012. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 23, no. 3, pp. 90-93. DOI

- 10.7171/jbt.12-2303-004.
- TAJIMA, F., 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics Society of America*, vol. 123, no. 3, pp. 585-595.
- TAYLOR, J. & ORLEY, R., 1977. The Past and Possible Future Spread of Africanized Honeybees in the Americas. *Bee World*, vol. 58, no. 1, pp. 19-30. DOI 10.1080/0005772X.1977.11097632.
- WALLBERG, A., HAN, F., WELLHAGEN, G., DAHLE, B., KAWATA, M., HADDAD, N., LUZ, Z., SIMÕES, P., ALLSOPP, M., KANDEMIR, I., DE-RÚA, P., PIRK, C. & WEBSTER, M., 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Publishing Group*, vol. 46, no. 10, pp. 1081-1088. DOI 10.1038/ng.3077.
- WONNAPINIJ, P., CHINNERY, P. & SAMUELS, D., 2008. The Distribution of Mitochondrial DNA Heteroplasmy Due to Random Genetic Drift. *The American Journal of Human Genetics*, vol. 83, no. 5, pp. 582-593. DOI 10.1016/j.ajhg.2008.10.007.
- XUE, X., WU, L. & WANG, K., 1992. Chemical Composition of Royal Jelly. *Springer*, pp. 181-190. DOI 10.1007/978-3-319-59689-1.
- ZEVALLOS, P. & PÉREZ, E., 1990. *Determinación del Potencial Melífero de los Bosques Secundarios de Pucallpa*. S.I.: Universidad Agraria La Molina.

10. ANEXOS

10.1 Ficha de Registro de apiarios muestreados

FICHA DE REGISTRO

I. DATOS GENERALES

Nombre común	Especie/Subespecie	N° muestras
Departamento	Localidad	Coordenadas
Colector	Fecha de colecta	

II. DATOS DE COLMENA

Nombre de Apiario	N° colmenas
Antigüedad de colmena (meses)	Localidad de origen y/o adquisición

III. DATOS DE SALUBRIDAD

Salud de colmenas	Presencia de enfermedades
Buena <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Mala <input type="checkbox"/>	

Especifique:

IV. OTROS

¿Cuál es el principal problema que enfrenta como apicultor?

¿El comportamiento de sus abejas es dócil o agresivo?

¿Cuál es el principal cultivo del que se alimentan sus abejas?

10.2 Lista de muestras procesadas y analizadas por cada gen

Departamento	ID	N° muestras procesadas			N° muestras analizadas		
		ND5	16S rRNA	COI	ND5	16S rRNA	COI
Apurímac	AP	1	1	1	1	1	1
Arequipa	AR	4	4	4	3	3	4
Cusco	CU	3	3	3	3	3	3
Huánuco	HU	4	4	4	4	4	4
Ica	IC	1	1	1	1	1	1
Junín	JU	2	2	2	2	2	2
La Libertad	LL	1	1	1	1	1	1
Lambayeque	LA	1	1	1	0	1	1
Lima	LI	7	7	7	7	7	7
Loreto	LO	1	1	1	1	1	1
Piura	PI	3	3	3	3	3	3
San Martín	SM	2	2	2	2	2	2
Total		30	30	30	28	29	30

10.3 Porcentajes de identidad obtenidos con la herramienta BLAST de la base de datos del GenBank

- Gen ND5
 - Haplotipo I

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher UP mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552702.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher SP mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552701.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher PT mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552700.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher KR mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552699.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher BL mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552698.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis x Apis mellifera scutellata voucher KL mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552697.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher WD mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552696.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher SW mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552695.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher ST mitochondrion, complete genome	1465	1465	100%	0.0	100.00%	MG552694.1				

○ Haplotype II

Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7294 mitochondrion .complete genome	1469	1469	100%	0.0	100.00%	MH341408.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera meda voucher 3284 mitochondrion .complete genome	1469	1469	100%	0.0	100.00%	KY464957.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7293 mitochondrion .complete genome	1458	1458	100%	0.0	99.75%	MH341407.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA .complete genome .strain: Italian	1458	1458	100%	0.0	99.75%	AP018435.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA .complete genome .strain: buckfast	1458	1458	100%	0.0	99.75%	AP018432.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica mitochondrion .complete genome	1458	1458	100%	0.0	99.75%	KX908209.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica complete mitochondrial genome	1458	1458	100%	0.0	99.75%	L06178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mellifera voucher 1410 mitochondrion .complete genome	1452	1452	100%	0.0	99.62%	KY926884.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrion .partial genome	1452	1452	100%	0.0	99.62%	KT164619.1

○ Haplotype III

Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7294 mitochondrion .complete genome	1459	1459	100%	0.0	99.87%	MH341408.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7293 mitochondrion .complete genome	1459	1459	100%	0.0	99.87%	MH341407.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA .complete genome .strain: Italian	1459	1459	100%	0.0	99.87%	AP018435.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA .complete genome .strain: buckfast	1459	1459	100%	0.0	99.87%	AP018432.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica mitochondrion .complete genome	1459	1459	100%	0.0	99.87%	KX908209.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera meda voucher 3284 mitochondrion .complete genome	1459	1459	100%	0.0	99.87%	KY464957.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica complete mitochondrial genome	1459	1459	100%	0.0	99.87%	L06178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mellifera voucher 1410 mitochondrion .complete genome	1443	1443	100%	0.0	99.50%	KY926884.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrion .partial genome	1443	1443	100%	0.0	99.50%	KT164619.1

➤ Gen 16S rRNA

○ Haplotype I

Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100

?

☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera caucasica mitochondrial DNA .complete genome	1700	1700	100%	0.0	100.00%	AP018404.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carpatica mitochondrial DNA .complete genome	1700	1700	100%	0.0	100.00%	AP018403.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA .complete genome .strain: Italian	1700	1700	100%	0.0	100.00%	AP018435.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera meda voucher 3284 mitochondrion .complete genome	1700	1700	100%	0.0	100.00%	KY464957.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Lasovo Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene .partial sequence: mitochondrial	1700	1700	100%	0.0	100.00%	JQ778289.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Graskovo Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene .partial sequence: mitochondrial	1700	1700	100%	0.0	100.00%	JQ778286.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Balinac Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene .partial sequence: mitochondrial	1700	1700	100%	0.0	100.00%	JQ778284.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica mitochondrion .complete genome	1694	1694	100%	0.0	99.89%	MN250878.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7294 mitochondrion .complete genome	1694	1694	100%	0.0	99.89%	MH341408.1

○ Haplotipo II

Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100

?

☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher UP mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552702.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher SP mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552701.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher PT mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552700.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher KR mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552699.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis x Apis mellifera scutellata voucher KL mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552697.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher WD mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552696.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher ST mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552694.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher SF mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552693.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher RD mitochondrion, complete genome	1681	1681	100%	0.0	100.00%	MG552692.1

○ Haplotipo III

Sequences producing significant alignments

Download

Manage Columns

Show

100

?

☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Bogdinac Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	1709	1709	100%	0.0	100.00%	JQ778283.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA, complete genome, strain: buckfast	1707	1707	99%	0.0	100.00%	AP018432.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica mitochondrion, complete genome	1707	1707	99%	0.0	100.00%	KX908209.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera haplotype 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	1707	1707	99%	0.0	100.00%	JF825878.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Lasovo Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	1703	1703	100%	0.0	99.89%	JQ778289.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Gradskovo Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	1703	1703	100%	0.0	99.89%	JQ778286.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carnica breeding line Ballinac Aneta Georgijev 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: mitochondrial	1703	1703	100%	0.0	99.89%	JQ778284.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7293 mitochondrion, complete genome	1701	1701	99%	0.0	99.89%	MH341407.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA, complete genome, strain: Italian	1701	1701	99%	0.0	99.89%	AP018435.1

➤ Gen COI

○ Haplotipo I

Sequences producing significant alignments		Download	Manage Columns	Show	100		
<input checked="" type="checkbox"/> select all	100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica voucher CNU7293 mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MH341407.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA, complete genome, strain: Italian	1794	1794	100%	0.0	100.00%	AP018435.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera mitochondrial DNA, complete genome, strain: buckfast	1794	1794	100%	0.0	100.00%	AP018432.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera ligustica mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	KX908209.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carpatica isolate 16F-3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MF100924.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carpatica isolate 8Y-5 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MF100922.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carpatica isolate 6Y-2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MF100921.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carpatica isolate 6-75 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MF100919.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera carpatica isolate 6-31 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MF100918.1

○ Haplotipo II

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	?
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher UP mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MG552702.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis x Apis mellifera scutellata voucher KL mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MG552697.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher ST mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MG552694.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher LB mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MG552687.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	KJ601784.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher VR mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552703.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher SP mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552701.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher PT mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552700.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher KR mitochondrion, complete genome	1783	1783	100%	0.0	99.79%	MG552699.1				

○ Haplotipo III

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	?
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher KR mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552699.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera iberica isolate iberi3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial product	1783	1783	100%	0.0	99.79%	AY114479.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher UP mitochondrion, complete genome	1777	1777	100%	0.0	99.69%	MG552702.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis x Apis mellifera scutellata voucher KL mitochondrion, complete genome	1777	1777	100%	0.0	99.69%	MG552697.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher ST mitochondrion, complete genome	1777	1777	100%	0.0	99.69%	MG552694.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher LB mitochondrion, complete genome	1777	1777	100%	0.0	99.69%	MG552687.1				

○ Haplotipo IV

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	?
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher PT mitochondrion, complete genome	1794	1794	100%	0.0	100.00%	MG552700.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher UP mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552702.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis x Apis mellifera scutellata voucher KL mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552697.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher ST mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552694.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera capensis voucher LB mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	MG552687.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata mitochondrion, complete genome	1788	1788	100%	0.0	99.90%	KJ601784.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher VR mitochondrion, complete genome	1783	1783	100%	0.0	99.79%	MG552703.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher SP mitochondrion, complete genome	1783	1783	100%	0.0	99.79%	MG552701.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera scutellata voucher KR mitochondrion, complete genome	1777	1777	100%	0.0	99.69%	MG552699.1				